

Aus dem Hygiene-Institut der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

VERÄNDERUNG DER KEIMRESISTENZ UND
DESINFEKTIONSMITTELWIRKUNG IM
QUANTITATIVEN SUSPENSIONSTEST

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz,

den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Christoph Engelhardt

aus Rostock

1979

Mainz 1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Hygiene-Institut der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

VERÄNDERUNG DER KEIMRESISTENZ UND
DESINFEKTIONSMITTELWIRKUNG IM
QUANTITATIVEN SUSPENSIONSTEST

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz,

den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Christoph Engelhardt

aus Rostock

Mainz 1978



Fachbereichsdekan: Professor Dr. G. Mann

1. Gutachter: Professor Dr. H.-P. Werner

2. Gutachter: Professor Dr. J. Borneff

Tag der mündlichen Prüfung : 17. Jan. 1979

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.0	Vorwort	1
2.0	Einleitung	3
3.0	Experimentelle Aufgabe	4
3.1	Der Einfluß verschiedener Inaktivierungsmedien	4
3.2	Der Einfluß verschiedener Keimsuspensionsmedien	6
3.3	Der Einfluß verschiedener Vorkulturmedien	6
3.4	Begriffsdefinitionen und theoretische Überlegungen	7
4.0	Testkeime, Nährmedien, Desinfektionsmittelstandards, Inaktivierungsmedien, weitere Reagenzien	11
4.1	Testkeime	11
4.2	Zusammensetzung und Rezeptur der Nährmedien	11
4.3	Zusammensetzung und Rezeptur der Desinfektionsmittelstandards	12
4.4	Zusammensetzung und Rezeptur der geprüften Inaktivierungsmedien	13
4.5	Zusammensetzung und Rezeptur weiterer Reagenzien	13
5.0	Versuchsbeschreibung und Ergebnisse	14
5.1.0	Allgemeine Methodik des Quantitativen Suspensions-tests	14
5.1.1	Vorkultur	14
5.1.2	Herstellung der Desinfektionsmittelstandardkonzentration	14
5.1.3	Einwirkung der Desinfektionsmittelstandardlösung auf die Keimsuspension	14
5.1.4	Desinfektionsmittelinaktivierung und Nachkultur	15
5.1.5	Keimzahlbestimmung	15
5.1.6	Versuchsauswertung und Berechnung anhand eines Beispiels	17
5.2.0	Bestimmung geeigneter Desinfektionsmittelstandardkonzentrationen im Quantitativen Suspensionstest	19
5.2.1	Methodik	19
5.2.2	Ergebnisse	19

5.3.0.	Ermittlung geeigneter Inaktivierungsmedien im Quantitativen Suspensionstest und im Bakterio- stase - versuch nach den Richtlinien der DGHM.	20
5.3.1.0	Ermittlung geeigneter Inaktivierungsmedien im Quantitativen Suspensionstest	20
5.3.1.1	Methodik	20
5.3.1.2	Ergebnisse	20
5.3.2.0	Ermittlung geeigneter Inaktivierungsmedien im Bakterio- staseversuch nach den Richtlinien der DGHM unter Berücksichtigung zweier verschiedener Nähr- medien	28
5.3.2.1	Methodik	28
5.3.2.2	Ergebnisse	29
5.4.0	Vergleichende Untersuchung des Einflusses von 3 Keim- suspensionsmedien auf die Rückgewinnungsrate und / oder die Keimresistenz im Quantitativen Suspensions- test	34
5.4.1	Methodik	34
5.4.2	Ergebnisse	34
5.5.0	Chemischer Nachweis von freiem, molekularem Jod in einer 0,1 %igen Jodophorstandardlösung	41
5.5.1	Methodik	41
5.5.2	Ergebnis	41
5.6.0	Vergleichende Untersuchung des Einflusses von 3 Vor- kulturmedien auf die Keimresistenz im Quantitativen Suspensionstest	43
5.6.1	Methodik	43
5.6.2	Ergebnisse	43
5.7.0	Vergleichende Zusammenfassung aller Ergebnisse	45
5.7.1	Desinfektionsmittelstandardkonzentrationen	45
5.7.2	Inaktivierungsmedien	47
5.7.3	Suspensionsmedien	47
5.7.4	Vorkulturmedien	49
6.0	Diskussion	49
7.0	Empfehlungen	59
8.0	Zusammenfassung	60
9.0	Literaturverzeichnis	62
10.0	Abkürzungen	67

Vorwort

Desinfektions- und Sterilisationsmaßnahmen stellen zweifellos wichtige Voraussetzungen für die teilweise bedeutenden Fortschritte dar, die im Bereich der Human- und Veterinärmedizin, der Seuchenbekämpfung und der Trinkwasser- sowie Lebensmittelhygiene in den vergangenen Jahrzehnten erzielt worden sind. Als ein Beispiel sei auf die Erfolge in der Chirurgie verwiesen, die ohne Instrumentensterilisation, chirurgische Händedesinfektion, Desinfektion des Wundgebiets etc. wohl nicht möglich gewesen wären.

In allen Anwendungsbereichen spielt die Desinfektion mit chemischen Mitteln eine große Rolle. Mit der zunehmenden Entwicklung in allen medizinischen Bereichen steigen allerdings auch die Ansprüche, die an Desinfektionsverfahren gestellt werden. Nach der Definition versteht man unter Desinfektion eine gezielte Entkeimung mit dem Zweck, die Übertragung bestimmter unerwünschter Mikroorganismen durch Eingriffe in deren Struktur oder Stoffwechsel unabhängig von ihrem Funktionszustand zu verhindern (22). REBER fordert, daß ein "ideales" chemisches Desinfektionsverfahren bzw. ein Desinfektionsmittel (DIM) folgende Bedingungen erfüllt:

- Beseitigung aller unerwünschten Keime
- Indifferentes Verhalten gegenüber dem zu desinfizierenden Material
- Unschädlichkeit gegenüber Mensch, Tier und Umwelt
- Kompatibilität mit bestimmten chemischen Stoffen wie Eiweiß, Schleim, Detergentien etc.
- Flexibilität in der Anwendung
- Bestimmte chemische und physikalische Eigenschaften wie Stabilität, neutraler pH etc. (23).

Ein DIM, das allen Anforderungen gerecht wird, gibt es zur Zeit nicht (31). Die Wahl eines DIM bzw. eines Desinfektionsverfahrens muß sich nach den jeweiligen Erfordernissen richten. Bevor allerdings die Auswahl getroffen werden kann, müssen die Eigenschaften des DIM bekannt sein. Neben der bakteriziden Konzentration bei gegebener Einwirkungszeit sind das Erregerspektrum, die möglichen wirkungsverändernden Interaktionen mit organischen oder anorganischen Substanzen und schädigende Wirkungen auf Mensch oder Tier usw. zu prüfen. Entsprechend der Vielzahl der Anwendungsgebiete (Flächen-, Raum-, Trinkwasser-, Wäsche- und Wunddesinfektion) muß zudem

die Bedeutung der einzelnen Eigenschaften eines DIM unterschiedlich bewertet werden.

In den letzten Jahren wurden von vielen Fachleuten in nationaler sowie internationaler Zusammenarbeit große Anstrengungen unternommen, Testansätze und -kombinationen zu entwickeln, die eine Wertbestimmung der desinfizierenden Wirksamkeit von DIM ermöglichen; erwähnt seien die Testmethoden der Association of Official Agricultural Chemists (A.O.A.C.), USA (2), der Kommission für Phytopharmazie, Niederlande (16, 21), der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, DGHM (1), sowie die Empfehlungen von KELSEY und SYKES (15).

Es zeigten sich allerdings auf internationaler Ebene zum Teil erhebliche Bewertungsunterschiede bei der Testung ein und desselben Präparates, die sich in verschiedenen Dosierungs- und Anwendungsempfehlungen niederschlugen. So beträgt die zulässige Anwendungskonzentration für ein Aldehyd-Standardgemisch (Testkeim: *Staph. aureus*) bei Testung nach der Methode der Kommission für Phytopharmazie 1,0 %; 2,0 % nach der Methode von KELSEY und SYKES, und 0,5 % bei Testung nach der Flächenabdruckmethode (34).

Diese Diskrepanzen sind in erster Linie auf die unterschiedlichen Testmethoden, basierend auf verschiedenen Anschauungen bezüglich der Bewertung der Wirksamkeit von chemischen Desinfektionsverfahren, und die damit verbundene unterschiedliche Aussagekraft der einzelnen Tests zurückzuführen. Ein Vergleich der Testergebnisse verschiedener Methoden erscheint aus den obengenannten Gründen unmöglich (33).

Aber auch auf nationaler Ebene werden Bewertungsdifferenzen für ein Präparat gefunden, wenn Unterschiede in der Auswahl der Testkeime, des Nährmediums und vieler anderer Faktoren, auf die später noch näher eingegangen wird, bestehen. Aus diesem Grund werden verstärkt Anstrengungen unternommen, die große Anzahl der Testmethoden zu vereinheitlichen, ohne dabei die Aussagekraft einzuschränken, und die Bedingungen, nach denen die Tests durchzuführen sind, weitgehend zu standardisieren (33, 3).

2.0 Einleitung

Die von einem deutschen Autorenkollektiv (3) empfohlenen Prüfungsmethoden zur Bewertung der Wirksamkeit chemischer Desinfektionsverfahren lassen sich in 2 Gruppen einteilen. Zu den In-Vitro-Tests zählen der Qualitative und Quantitative Suspensionstest sowie die Keimträgermethode, mit deren Hilfe Daten über die notwendigen Konzentrationen zur Keimabtötung bei unterschiedlichen Einwirkungszeiten eines Desinfektionsmittels gewonnen werden. Die zweite Gruppe umfaßt die Testmethoden unter praxisnahen Bedingungen; hierzu gehören die Chirurgische und Hygienische Händedesinfektion, die Chemische und Chemothermische Wäschedesinfektion, die Flächendesinfektion, die Instrumentendesinfektion sowie die Stuhl- und Sputumdesinfektion. Sie gestatten exakte Empfehlungen für das jeweilige Desinfektionsverfahren.

Das in dieser Arbeit angewandte Quantitative In-Vitro-Prüfungsverfahren (27) hat gegenüber den qualitativen Methoden den Vorteil, daß die bakterizide Potenz eines DIM durch einen logarithmischen Differenzbetrag zwischen der Anzahl der koloniebildenden Einheiten pro Milliliter (KBE/ml) mit und ohne Einwirkung des Präparates bei gegebener Desinfektionsmittelkonzentration und -einwirkungszeit charakterisiert werden kann. Die so gewonnenen Daten bezüglich verschiedener DIM sind untereinander gut vergleichbar (33, 27). Gleichzeitig wird die für medizinische Bereiche besonders wichtige Bakterizidie eines Präparates beschrieben. Im Gegensatz zum Qualitativen Suspensionstest fallen bei dieser Technik die theoretischen und praktischen Schwierigkeiten bei der Feststellung einer 100%igen Abtötung der inokulierten Keimmenge nicht ins Gewicht (24, 6, 5).

Allerdings hängen die erzielten Resultate nicht nur von den Qualitäten des zu prüfenden DIM ab, sie werden auch von verschiedenen Faktoren innerhalb der Versuchsanordnung beeinflusst; zu diesen zählen:

- Die Auswahl der Testkeime hinsichtlich ihrer natürlichen Resistenzunterschiede gegenüber den einzelnen DIM (32, 8)
- Bebrütungszeit und -temperatur sowie Zusammensetzung der Nährmedien in der Vorkultur (25)
- Zeitpunkt der Herstellung der DIM-Lösung und Auswahl des Verdünnungsmittels (Wasser standardisierter Härte (SHW), doppelt destilliertes Wasser, einfach destilliertes Wasser) (3,1)

- Zusammensetzung des Keimsuspensionsmediums (27)
- Auswahl der Inaktivierungsmedien (18, 7)
- Temperatur, Volumen und Zusammensetzung der Nährböden in der Nachkultur (26, 14).

Durch Variation eines oder mehrerer der obengenannten Faktoren entstehen bei sonst identischer Versuchsmethodik und bei konstanter Konzentration sowie Einwirkungszeit des zu prüfenden DIM erhebliche Unterschiede in den Versuchsergebnissen. Die Vielfalt der möglichen unerwünschten Einflüsse zeigt, daß eine optimale Standardisierung jedes einzelnen Teilabschnittes innerhalb eines Versuchsablaufs notwendig ist.

3.0 Experimentelle Aufgabe

Die Einflüsse von 3 verschiedenen Faktoren auf die Rückgewinnungsrate, Resistenz und Rekultivierbarkeit von 3 Testkeimen im Quantitativen Suspensionstest sollen in dieser Arbeit untersucht werden.

Die Versuchsanordnung ist so zu wählen, daß der zu untersuchende Faktor unter konstanten Bedingungen innerhalb eines Testansatzes gegenüber dem jeweiligen Testkeim und DIM geprüft wird, damit festgestellte Differenzen in den Ergebnissen tatsächlich auf den getesteten Faktor zurückgeführt werden können.

Stellvertretend für eine Vielzahl von auf dem Markt befindlichen DIM auf Aldehyd-, Phenol- und Jodphorbasis sollen Standardpräparationen benutzt werden.

3.1 Der Einfluß verschiedener Inaktivierungsmedien

Bei DIM-Testungen, die mit flüssigen Medien durchgeführt werden, kommt es zwangsläufig zur Übertragung von kleinen DIM-Mengen in die Nachkultur, wobei diese geringen DIM-Reste oftmals ausreichen, eine bakteriostatische Wirkung auf die Keime über die vorgeschriebene DIM-Einwirkungszeit hinaus auszuüben. Da Mikroorganismen, die sich im Zustand der Bakteriostase befinden, mit üblichen Methoden in Kulturen nicht nachgewiesen werden können,

resultieren oft Ergebnisse, die die bakteriziden Eigenschaften eines Präparates irrtümlich als zu hoch erscheinen lassen. Dieser Irrtum ist besonders gefährlich, weil bakteriostatisch vorgeschädigte Bakterien unter bestimmten Umständen ihre Vermehrungsfähigkeit und damit auch ihre Infektiosität wiedergewinnen können (12).

Aus diesem Grund werden von vielen Autoren Verfahren empfohlen, mit deren Hilfe möglichst alle DIM-Reste in der Nachkultur neutralisiert werden sollen (20, 19, 18, 17, 11, 10, 9, 7, 4). Neben rein physikalischen Methoden wie Verdünnung, Filtration und Adsorption durch Aktivkohle werden vermehrt chemische Verbindungen eingesetzt (10). Diese Substanzen nennt man Inaktivierungsmedien (33). Sie sollen das DIM vollständig und mit hoher Geschwindigkeit neutralisieren, da bei langsamer Inaktivierung anfänglich noch wachstumshemmende Wirkungen auf die Nachkultur möglich sind. Das Medium selbst, sowie die bei der Neutralisation des DIM entstehenden Reaktionsprodukte, dürfen keine Toxizität gegenüber den Testkeimen besitzen (18).

Entsprechend der Vielzahl von chemischen Substanzen, die als DIM Verwendung finden, wird eine Reihe von Inaktivierungsmedien vorgeschlagen. Obwohl Versuche unternommen worden sind, ein Substanzgemisch zu entwickeln, das alle auf dem Markt befindlichen Präparate optimal neutralisiert, muß immer vor der eigentlichen DIM-Testung in Vorversuchen geklärt werden, welches der zur Auswahl stehenden Inaktivierungsmedien für die Neutralisation des jeweiligen Präparates geeignet ist (3, 1).

Neben dem unterschiedlichen Inaktivierungsvermögen der verschiedenen Mittel hat aber auch ihre mögliche Eigentoxizität erheblichen Einfluß auf die Rekultivierbarkeit der Keime. Kompliziert wird die Situation dadurch, daß die Sensitivität gegenüber toxischen Effekten sowie das Ausmaß der toxischen Schädigung vom Zustand der Keimpopulation bzw. des einzelnen Keimes abhängt. Eine potentiell toxische Substanz kann sich gegenüber ungeschädigten Bakterien völlig indifferent verhalten, während sie bei spezifisch vorgeschädigten Keimen Bakterio- oder Bakterizidie bewirken kann.

In dem von der DGHM empfohlenen Verfahren zur Bestimmung geeigneter Inaktivierungsmittel werden ungeschädigte Testkeime zu einem DIM-Inaktivierungsmittel-Nährmedium-Gemisch gegeben, während im Quantitativen Suspensionstest

durch DIM-Wirkung bereits vorgeschädigte Keime zu den Inaktivierungsmedien pipettiert werden. Zum Vergleich testeten wir die ausgewählten Inaktivierungsmittel sowohl im Quantitativen Suspensionstest, als auch in dem von der DGHM empfohlenen Verfahren keim- und DIM-spezifisch auf ihre Eignung.

3.2 Der Einfluß verschiedener Keimsuspensionsmedien

Bevor die Keime mit dem DIM in Kontakt kommen, müssen sie in einem flüssigen Medium suspendiert werden. Von dieser Keimsuspension wird dann ein bestimmtes Volumen zu dem DIM-Ansatz pipettiert. Es läßt sich dabei nicht vermeiden, daß neben den Bakterien auch Suspensionsmedium mitübertragen wird, was die Effektivität des DIM beeinflussen kann. So ist z. B. bekannt, daß phenol- oder jodophorhaltige DIM erheblich an Wirksamkeit verlieren, wenn sie mit eiweißhaltigen Substanzen vermischt werden (13). Weiterhin ist nicht auszuschließen, daß die Resistenz der jeweiligen Keimpopulation durch die verschiedenen Suspensionsmedien beeinflusst wird, und dadurch unterschiedliche Keimrückgewinnungsraten bei der Testung eines DIM entstehen. Bei sofortiger Verwendung der Suspension wird dieser Mechanismus nicht ins Gewicht fallen. Vergeht aber einige Zeit bis zum Kontakt mit dem DIM, so ist eine Resistenzbeeinflussung durch das jeweilige Suspensionsmedium durchaus möglich.

Um diesem Zeitfaktor Rechnung zu tragen und dadurch den Ansatz empfindlicher zu gestalten, wurden in der Folge die Quantitativen Suspensionstests 30 Min. bzw. 5 Std. nach Herstellen der Keimsuspension durchgeführt.

3.3 Der Einfluß verschiedener Vorkulturmedien

Die Resistenz einer Keimspezies gegenüber einem bestimmten DIM hängt u. a. von der Zusammensetzung des Nährmediums in der Vorkultur ab (25). Wird ein Bakterienstamm auf verschiedenen Medien gezüchtet, so kann sich dadurch eine Veränderung seiner Widerstandskraft gegenüber Noxen ergeben, was sich bei DIM-Testungen in unterschiedlichen Rückgewinnungsraten niederschlagen wird.

Die Resistenz eines Keimes hängt aber auch von der Art der Noxe ab; so kann die Resistenz eines Bakterienstamms gegenüber einem DIM auf Aldehydbasis erhebliche Ausmaße erreichen, während diese Keimart gegenüber phenolhaltigen DIM sehr empfindlich ist.

Weiterhin differieren die Ansprüche an das jeweils optimale Nährmedium von Keimspezies zu Keimspezies.

Neben den zu prüfenden Faktoren (Inaktivierungs-, Suspensions- und Vor-kulturmedien) sind also auch immer die spezifischen Eigenschaften der Testkeime und die Art der Noxe (chemische Zusammensetzung der DIM) zu berücksichtigen. Aus diesem Grunde müssen die Versuche so angeordnet werden, daß die zu testende Variable keim- und DIM-spezifisch, d. h. immer nur mit einem Testkeim und einem DIM, vergleichend geprüft wird.

3.4

Begriffsdefinitionen und theoretische Überlegungen

Unter Keimrückgewinnungsrate versteht man die Menge an rückgewinnbaren Keimen in Prozent, die bezogen auf die Ausgangskeimmenge nach einer Manipulation noch rekultivierbar ist. Mit Rekultivierbarkeit wird das Ausmaß der Fähigkeit einer Keimpopulation beschrieben, nach einer Vorbehandlung Kolonien auf festen Nährböden zu bilden.

Beispiel: 10 vermehrungsfähige Keime eines Bakterienstammes befinden sich auf einer festen Unterlage. Mit Hilfe eines sterilen Stempels wird ein Abdruck genommen, der dann auf einen Nährboden gedrückt wird. Nach Inkubation sieht man das Wachstum von 8 Kolonien.

Die Rückgewinnungsrate beträgt demnach 80 %. Die Rekultivierbarkeit der Keime ist durch Stempeldruck, Stempelbeschaffenheit und Zusammensetzung des Nachkulturmediums dermaßen beeinflußt worden, daß von ursprünglich 10 vermehrungsfähigen Mikroorganismen nur 8 Keime Kolonien bilden.

Überträgt man dieses Beispiel auf die in dieser Arbeit angewandte Methodik des Quantitativen Suspensionstests, so kann festgestellt werden: Im Quantitativen Suspensionstest erfolgt keine direkte Messung der Rückgewinnungsrate und Rekultivierbarkeit, sondern eine Bestimmung der Anzahl der Kolonien, die durch unterschiedliche Einflüsse auf die Rückgewinnungsrate und Rekultivierbarkeit einer Keimmenge in einer Nachkultur anwachsen.

Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) ist eine direkte Funktion der Rückgewinnungsrate und Rekultivierbarkeit - niedrige Rückgewinnungsrate und schlechte Rekultivierbarkeit bedeuten eine relativ geringe Anzahl von KBE und umgekehrt- welche aber aus folgendem Grund im Quantitativen Suspensionstest nicht direkt bestimmbar sind:

Der Test wird mit flüssigen Medien durchgeführt. Theoretisch könnte die Keimmenge/ml in der Ausgangssuspension und in der Suspension nach DIM-Einwirkung direkt bestimmt werden, z. B. durch mikroskopische Zählung, was einer direkten Bestimmung der Rückgewinnungsrate gleich käme. Im Quantitativen Suspensionstest jedoch wird die Anzahl der KBE ermittelt. Zwischen einem einzelnen, lebenden Keim, direkt in einem flüssigen Medium mittels Mikroskop nachgewiesen, und einer Kolonie, zusammengesetzt aus Millionen dieser Bakterien, besteht allerdings ein großer Unterschied. Nicht alle Kolonien entstehen zwangsläufig aus einem einzelnen Keim, oft ist der Ausgang ein Konglomerat mehrerer Mikroorganismen. Je größer die Anzahl solcher lebensfähiger, rückgewinnbarer Konglomerate nach DIM-Einwirkung ist, desto größer wird die Anzahl der zu zählenden KBE sein. Hier wird der Einfluß des DIM auf die Rückgewinnungsrate deutlich. Die Anzahl der KBE hängt aber nicht nur von der Menge der lebensfähigen Konglomerate nach DIM-Einwirkung ab, sondern auch von ihrer Rekultivierbarkeit, d. h. ihrer Fähigkeit, Kolonien zu bilden. Die Rekultivierbarkeit wird wohl in erster Linie vom Zustand der rückgewinnbaren Keime (Ausmaß der Vorschädigung) und von der Zusammensetzung des Nährmediums in der Nachkultur (Anpassung an den Substratbedarf der Keime) beeinflußt.

Die Zahl der KBE in der Nachkultur wird demnach von der Menge an rückgewinnbaren Keimen nach DIM-Einwirkung und von ihrer Rekultivierbarkeit bestimmt.

Im Quantitativen Suspensionstest entspricht nun die Anzahl der KBE/ml, ermittelt durch die Keimzahlbestimmung, der Ausgangskeimmenge in Suspension, und der dekadische Logarithmus aus der Anzahl KBE/ml nach DIM- bzw. Wassereinwirkung ($\log KBE_D$, $\log KBE_0$) den rückgewinnbaren Keimengen in Suspension nach DIM- bzw. Wassereinwirkung (Kontrolle). Die Anzahl der KBE/ml muß mit den jeweils entsprechenden Keimengen in Suspension nicht identisch sein, da hier die Rekultivierbarkeit der rückgewinnbaren Mikroorganismen eine erhebliche Rolle spielt.

Die Differenz aus $\log KBE_0$ und $\log KBE_D$ ergibt den Reduktionsfaktor (RF); also einen relativen Wert, der die DIM-Wirkung charakterisiert. Jede Änderung des $\log KBE_D$, aber auch des $\log KBE_0$, wird sich somit in einem unterschiedlichen RF niederschlagen.

Die Rückgewinnungsrate und die Rekultivierbarkeit hängen nicht nur vom DIM und der Einwirkungszeit ab, sondern unterliegen auch anderen bereits erwähnten Einflüssen. Die 3 in dieser Arbeit untersuchten Faktoren können an ganz verschiedenen Punkten angreifen: Sie können die Keimresistenz, die DIM-Wirkung und/oder die Rekultivierbarkeit beeinflussen. Jede Veränderung eines oder mehrerer dieser Faktoren wird zwangsläufig bei konstanter DIM-Konzentration und -Einwirkungszeit eine Veränderung der Rückgewinnungsrate und/oder der Rekultivierbarkeit, und damit auch eine Veränderung der Anzahl der KBE ($\log KBE_D$, $\log KBE_0$, RF) bewirken.

Diese Änderung ist aber direkt nicht messbar, wir können im Quantitativen Suspensionstest nur die Änderung der Anzahl der KBE feststellen, welche durch die Variation der Rückgewinnungsrate und Rekultivierbarkeit bedingt ist. In diesem Zusammenhang sei betont, daß die Einflüsse auf die Rückgewinnungsrate nach DIM-Einwirkung und auf die der Kontrolle nicht identisch sind.

Der folgenden Abb. 1 sind die oben dargestellten Überlegungen zu entnehmen.

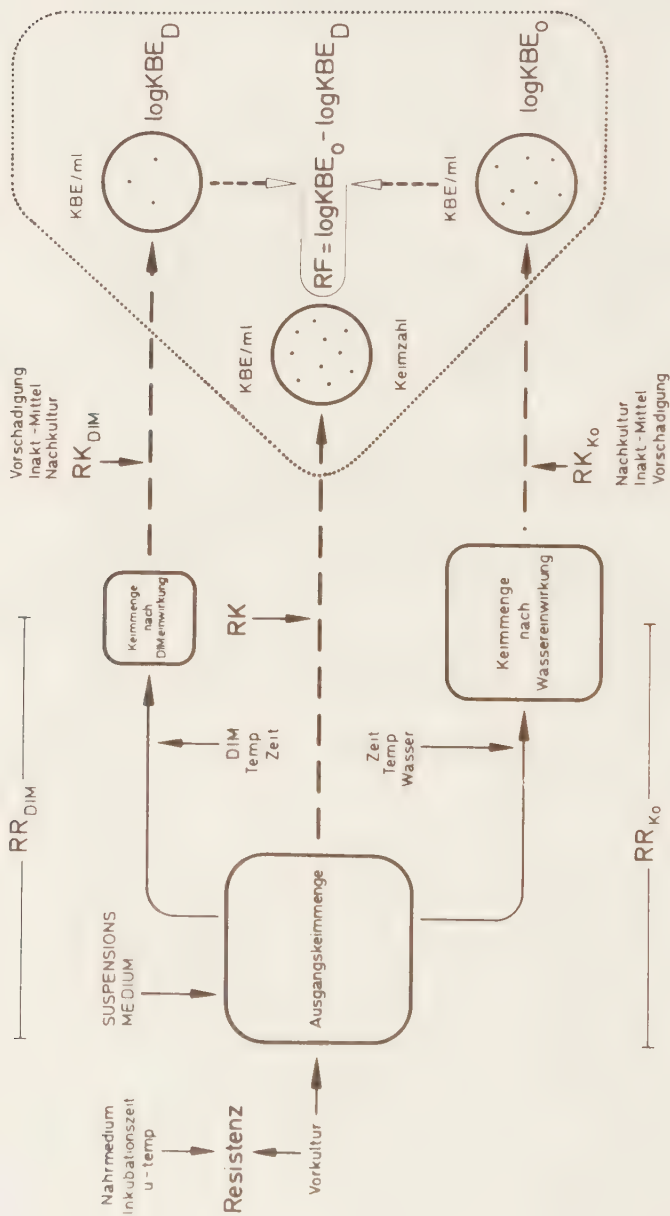


Abb. 1. Darstellung der theoretischen Überlegungen zum Quantitativen Suspensionstest

Abb. 1: Temp. = Temperatur, Inakt.-Mittel = Inaktivierungsmittel, Ko = Kontrolle, RR = Rückgewinnungsrate, RK = Reaktivierbarkeit. Die gepunktete Linie kennzeichnet den direkt bestimmbaren Bereich des Versuchsaufbaus.

4.0 Testkeime, Nährmedien, DIM-Standards, Inaktivierungsmedien,
weitere Reagenzien

4.1 Testkeime

Staph. aureus ATCC 6538

P. aeruginosa ATCC 15442

Strept. faecalis ATCC 6057

Die Stammkulturen wurden auf Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Agar (CSA) gezüchtet. Nach 14-tägigen Intervallen erfolgte Überimpfung auf frisch angesetzte CSA-Nährböden und Bebrütung bei 37° C für 24 Std.. Aufbewahrung im Eisschrank bei 4 ± 1° C.

4.2 Zusammensetzung und Rezeptur der Nährmedien

Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Agar (CSA), Firma OXOID.

Tryptone (Oxoid L 42) 15,0 g

Soya Peptone (Oxoid L 44) 5,0 g

Sodium Chloride 5,0 g

Agar No. 3 (Oxoid L 13) 15,0 g

pH: 7,3

40 g des Pulvers wurden in 1 Liter frisch destilliertem Wasser unter Erhitzen gelöst. Danach Sterilisation im Autoklaven 121° C/15 Min.. Je 20 ml des flüssigen, erhitzten Agars gaben wir in Petri-Schalen Ø = 9 cm.

Brain-Heart-Infusion-Agar (BHI-A), Firma DIFCO

Calf Brains, Infusion from 200,0 g

Beef Hearts, Infusion from 250,0 g

Proteose Peptone 10,0 g

Bacto-Dextrose 2,0 g

Sodium Chloride 5,0 g

Disodium Phosphate 2,5 g

Bacto-Agar 15,0 g

pH: 7,4

52 g des Pulvers lösten wir in 1 Liter frisch destilliertem Wasser durch Erhitzen. Sterilisation im Autoklaven 121° C/15 Min.. Je 20 ml des flüssigen, erhitzten Agars wurden in Petri-Schalen Ø = 8,9 cm gegeben.

Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung (CSL), Firma OXOID

Pancreatic Digest of Casein (Oxoid L 42) 17,0 g

Papaic Digest of Soy Bean Meal (Oxoid L 44) 3,0 g

Sodium Chloride 5,0 g

Dibasic Potassium Phosphate 2,5 g

Dextrose 2,5 g

pH: 7,3 ± 0,1

30 g des Pulvers wurden unter Erhitzen in 1 Liter frisch destilliertem Wasser gelöst. Abfüllen in Röhrchen zu 10 ml. Sterilisation im Autoklaven 121° C/15 Min..

Standard-I-Bouillon (B), Firma MERCK

Spezialpepton	15,6 g
Hefeextrakt	2,8 g
Natriumchlorid	5,6 g
D (+)-Glucose	1,0 g
pH: 7,5 $\pm$ 0,1	

Nach Lösen von 25 g des Pulvers unter Erhitzen in 1 Liter frisch destilliertem Wasser erfolgte Abfüllen in Röhrchen zu 10 ml. Sterilisation im Autoklaven 121°C/15 Min..

4.3 Zusammensetzung und Rezeptur der DIM-Standards

Aldehyd-Standard: Formaldehyd (30 %ig, HÖCHST)	16,7 %
Glyoxal (40 %ig, BASF)	12,5 %
Glutardialdehyd (50 %ig, BASF)	5,0 %
Lutensol ON 79 (BASF)	5,0 %
n/10 Natronlauge (MERCK)	2,0 %
dest. Wasser	58,8 %

Unter Rühren wurden in eine Lösung von Lutensol ON 79 und dest. Wasser Formaldehyd, Glyoxal, Glutardialdehyd zugegeben und mit n/10 Natronlauge auf einen pH von 6 eingestellt. pH des Konzentrats 6,0. pH einer 1 %igen Lösung 5,4.

Phenol-Standard: 2-Phenylphenol (BAYER)	8,0 %
3-Methyl-4-Chlorphenol (BAYER)	4,0 %
2-Benzyl-4-Chlorphenol (BAYER)	3,0 %
Iso-Propanol (DEUTSCHE SHELL CHEMIE)	15,0 %
Mersolat W 93 (BAYER)	40,0 %
n/10 Essigsäure (MERCK)	8,5 %
dest. Wasser	21,5 %

2-Phenylphenol, 3-Methyl-4-Chlorphenol und 2-Benzyl-4-Chlorphenol wurden in Isopropanol suspendiert. Unter Rühren erfolgte die Zugabe von Mersolat W 93, n/10 Essigsäure und dest. Wasser bis zur klaren Lösung. pH des Konzentrats: 8,0. pH einer 1 %igen Lösung 6,3.

Jodophor-Standard: Jod (MERCK)	3,0 %
Lutensol SC 9224 (BASF)	30,0 %
Phosphorsäure (75 %ig, techn.)	5,0 %
Wasser	62,0 %

Nach Erwärmen (ca. 45°C) des Lutensols wurde unter ständigem Rühren das Jod bis zur vollständigen Lösung eingearbeitet. Um ein Sublimieren des Jods zu vermeiden, musste das Gefäß abgedeckt werden. Danach wurde zunächst die Phosphorsäure und am Ende das Wasser zugegeben, wobei bis zur völligen Homogenität zu rühren war. Das Produkt mußte vor der Abfüllung filtriert werden. pH des Konzentrats: 2,2. pH einer 2 %igen Lösung: 1,7.

4.4

Zusammensetzung und Rezeptur der geprüften Inaktivierungsmedien

TLC:	Polysorbate 80 (Tween 80, BBL)	30,0 g
	Lecithin	3,0 g
	Cystein	1,0 g
	Natriumchlorid	8,5 g
	Bacto-Trypton	1,0 g
	auf 1000 g mit Aqua bidest. aufgefüllt.	
TSHC:	Polysorbate 80 (Tween 80, BBL)	30,0 g
	Saponin	30,0 g
	Histidin	1,0 g
	Cystein	1,0 g
	Natriumchlorid	8,5 g
	Bacto-Trypton	1,0 g
	auf 1000 g mit Aqua bidest. aufgefüllt.	
TLH:	Polysorbate 80 (Tween 80, BBL)	30,0 g
	Lecithin	3,0 g
	Histidin	1,0 g
	Natriumchlorid	8,5 g
	Bacto-Trypton	1,0 g
	auf 1000 g mit Aqua bidest. aufgefüllt.	
TLH + Na.:	wie TLH, jedoch mit 5,0 g Natriumthiosulfat	
	auf 1000 g mit Aqua bidest. aufgefüllt.	
Natriumsulfit:	Na_2SO_3	5,0 g
	auf 1000 g mit Aqua bidest. aufgefüllt.	
m/20 Phosphatpuffer:		
	Stammlösung I: 8,905 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ wurden mit	
	Aqua bidest. auf 1000 g aufgefüllt.	
	Stammlösung II: 6,806 g KH_2PO_4 wurden mit Aqua	
	bidest. auf 1000 g aufgefüllt.	
	Zu 630 ml der Stammlösung I gaben wir 370 ml der	
	Stammlösung II. pH nach Sterilisation: 7,0.	

Bei den Inaktivierungsmitteln mit Lecithin wurde das Lecithin in Tween 80 im Mörser unter ständigem Rühren mit Hilfe von siedendem Aqua bidest. in Lösung gebracht.

4.5

Zusammensetzung und Rezeptur weiterer Reagenzien

Wasser standardisierter Härte (SHW), $17^\circ \text{dH} = 300 \text{ ppm}$:

Zu 11,76 ml einer 10 %igen Lösung $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ gaben wir 5 ml einer 10 %igen Lösung $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Die Lösung wurde in 3300 ml doppelt glasdestilliertem Wasser bei 121°C für 30 Min autoklaviert.
pH: 7,3 $\pm$ 0,2.

Verdünnungsflüssigkeit (VF):

Natriumchlorid	8,5 g
Bacto-Trypton	1,0 g
auf 1000 g mit Aqua bidest. aufgefüllt.	

Physiologische Kochsalzlösung:

Natriumchlorid	8,5 g
auf 1000 g mit Aqua bidest. aufgefüllt.	

Alle unter 4.4 und 4.5 aufgeführten Substanzen wurden im Autoklaven bei 121° C für 30 Min. sterilisiert.

5.0 Versuchsbeschreibung und Ergebnisse

5.1.0 Allgemeine Methodik des Quantitativen Suspensionstests

Alle Versuche außer den unter 5.3 beschriebenen Tests wurden nach der Methode des Quantitativen Suspensionstests durchgeführt (27).

5.1.1 Vorkultur

Staph. aureus und *P. aeruginosa* inkubierten wir bei 37° C für 24 ± 1 Std., *Strept. faecalis* bei 37° C für 72 ± 1 Std. in 10 ml CSL. Vor dem Versuchsbeginn wurden die Kulturen mit einem Schüttelmixer homogenisiert und durch Verdünnung mit CSL auf 10⁶ - 10⁹ KBE/ml eingestellt.

5.1.2 Herstellung der DIM-Standardkonzentrationen

Unmittelbar vor Versuchsbeginn setzten wir die gewünschten Konzentrationen mit SHW an; je 10 ml der DIM-Lösung kamen in Pyr ex-Röhrchen mit Schraubverschluss.

5.1.3 Einwirkung der DIM-Lösung auf die Keimsuspension

0,1 ml der Keimsuspension wurde zum Zeitpunkt 0 zu 10 ml der DIM-Lösung pipettiert. Danach erfolgte gründliche Durchmischung. Einwirkungszeit: 10 Min.-10 sec. Alle Versuche fanden bei Zimmertemperatur statt. Als Kontrolle gaben wir 0,1 ml der Keimsuspension zu 10 ml SHW und ließen dieses Gemisch ebenfalls 10 Min. stehen.

5.1.4 Desinfektionsmittelinaktivierung und Nachkultur

Nach 10-minütiger Kontaktzeit wurde 1 ml des DDM- bzw. Desinfektionsmittels zu 9 ml Inaktivierungsmittel pipettiert. Es folgte sofort eine gründliche Durchmischung mit einem Schüttelmixer. Nach kürzestem 5 und längstem 30 min. Kontakt wurden für den Ansatz mit DDM die Verdünnungsstufen 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , für den Kontrollansatz die Verdünnungsstufen 10^{-2} und 10^{-3} durch entsprechende Verdünnung in VF angelegt. Je Inaktivierungsmittel-Konzentrationsmisch kamen je 1 ml auf 3 CSA-Platten, von der Verdünnungsstufen (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) je 0,1 ml auf 3 CSA-Platten. Danach erfolgte die gleichmäßige Verteilung der überimpften Flüssigkeit mit einem sterilen Glasspatel. Anschließend inkubierten wir die mit Staph. aureus und P. aeruginosa beimpften Platten bei 37°C während 48 Std. und die Kulturen mit Strept. faecalis über 72 Std..

5.1.5 Keimzahlbestimmung

Jeder Versuch erforderte die Bestimmung der KBE/ml der Ausgangskonzentration. Durch Verdünnung in VF wurden von der Keimsuspension die Verdünnungsstufen 10^{-1} und 10^{-2} angelegt. Je 0,1 ml der entsprechenden Verdünnungsstufe überimpften wir auf eine CSA-Platte. Danach folgte Auszucht und Inkubation.

Abb. 2 veranschaulicht den allgemeinen Ablauf eines Quantitativen Suspensionstests.

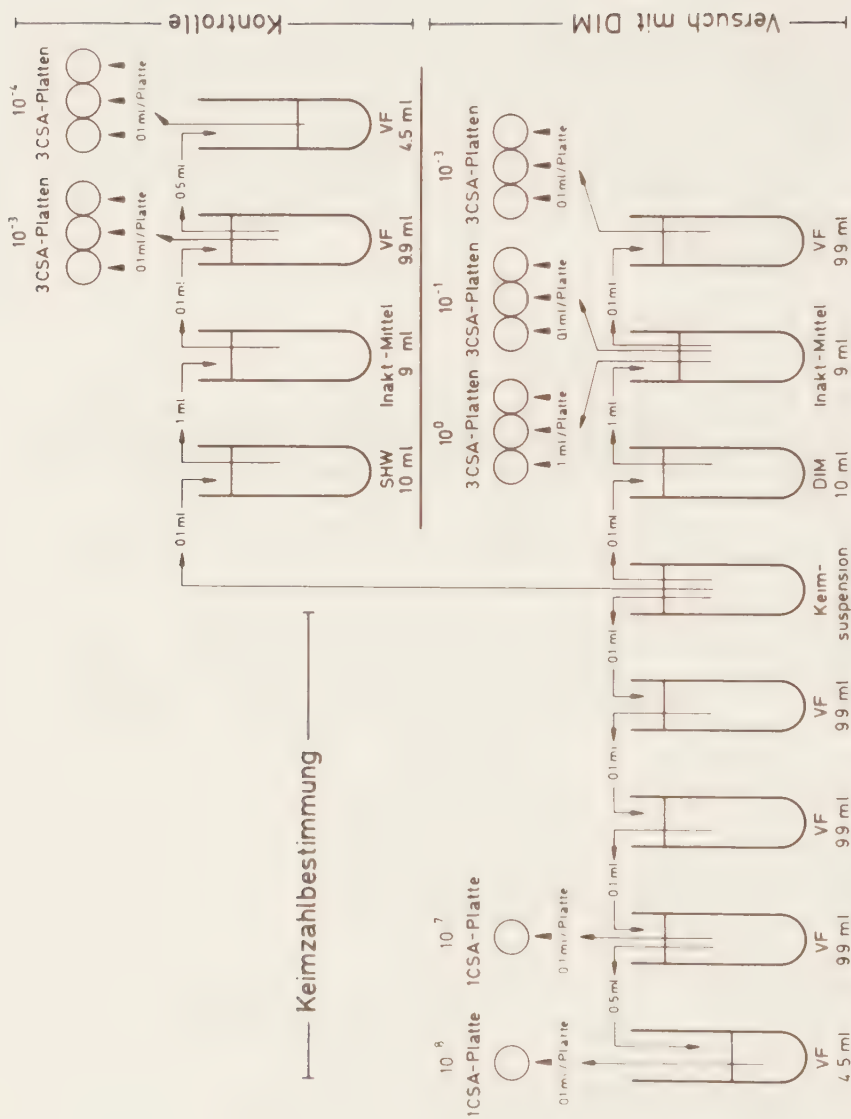


Abb. 2: Skizze vom Ablauf des Quantitativen Suspensionstests

5.1.6 Versuchsauswertung und Berechnung anhand eines Beispiels

Die Auszählung der KBE pro CSA-Platte erfolgte unter Lupenvergrößerung mit einem Koloniezählgerät. Für die nachfolgende Berechnung des Reduktionsfaktors (RF) wurden vorzugsweise die Platten derjenigen Verdünnungsstufe genommen, die eine KBE-Anzahl zwischen 20 und 300 pro Platte aufwiesen. Aus den 3 Werten einer Verdünnungsstufe wurde der arithmetische Mittelwert bestimmt und von diesem der dekadische Logarithmus errechnet.

Mit diesem Wert wird das Keimwachstum nach bzw. ohne DIM-Einwirkung beschrieben ($\log KBE_0$, $\log KBE_D$).

Der Reduktionsfaktor ist ein Maß für den keimtötenden Effekt eines DIM bei definierter Einwirkungszeit und bezieht sich auf die Reduktion der KBE pro ml. Er läßt sich nach folgender Formel berechnen:

$$RF = \log KBE_0 - \log KBE_D$$

$\log KBE_0$ = dek. Logarithmus aus der Anzahl KBE ohne DIM-Einwirkung (Kontrolle)

$\log KBE_D$ = dek. Logarithmus aus der Anzahl KBE nach DIM-Einwirkung

Tab. 1 zeigt als Beispiel einen Versuch, in dem der Einfluß verschiedener Keimsuspensionsmedien bei konstanter DIM-Konzentration und -Einwirkungszeit auf die Keimrückgewinnungsrate untersucht wurde.

In den waagrechten Spalten steht unter 1, 2, 3 die KBE-Anzahl pro CSA-Platte innerhalb einer Verdünnungsstufe, unter x der arithmetische Mittelwert der KBE der 3 angesetzten Platten pro Verdünnungsstufe. Der dekadische Logarithmus ist mit log bezeichnet, der Reduktionsfaktor für den Ansatz mit den jeweiligen Suspensionsmedien (CSL, NaCl, VF) mit RF. Für den Test mit CSL ergibt sich ein Mittelwert für die Verdünnungsstufe 10^{-1} von 73. Der Logarithmus beträgt 1,86; da eine Verdünnungsstufe von 10^{-1} besteht, beträgt der log KBE_D 2,86, und bei der Kontrolle entsprechend ein arithmetischer Mittelwert von 68,33 mit einem log KBE von 4,83 (Verdünnungsstufe 10^{-2} !). Bildet man die Differenz aus log KBE_U und log KBE_D, so erhält man den Reduktionsfaktor (RF), in diesem Falle: $4,83 - 2,86 = 1,97$. Das bedeutet, daß sich unter den im Abschnitt 5.5 beschriebenen Bedingungen bei Wahl von CSL als Suspensionsmedium die Anzahl der KBE der Kontrolle um den log-Faktor 1,97 verminderte, wenn man den Keim, in diesem Fall Staph. aureus, der Wirkung einer 0,03 %igen Jodophor-Standardlösung über 10 Min. aussetzte. Für NaCl und VF ergab sich kein Wachstum nach 10-minütiger Einwirkung einer 0,03 %igen Jodophor-Lösung, die Reduktionsfaktoren waren demnach größer als 4,73 und 4,62.

Alle die unter 5.1.1 bis 5.1.6 aufgeführten Bedingungen wurden bei den Quantitativen Suspensionstests dieser Arbeit beibehalten. In den nachfolgenden Versuchsbeschreibungen werden nur noch die jeweils variierten Faktoren angegeben.

5.2.0 Bestimmung geeigneter DIM-Standardkonzentrationen im Quantitativen Suspensionstest

Im Grenzbereich zwischen DIM-Unwirksamkeit und völliger Abtötung durch das DIM ließen sich die Einflüsse der verschiedenen Faktoren auf den Testkeim und die DIM-Wirkung am besten studieren, da hier in einem empfindlichen Bereich gearbeitet wurde.

5.2.1 Methodik

Durch Variation der DIM-Konzentration gegenüber den Testkeimen wurde diejenige keim- und desinfektionsmittelspezifische Konzentration ermittelt, die nach 10-minütiger Kontaktzeit einen Reduktionsfaktor zwischen 0,5 und 3,75 ergab.

5.2.2 Ergebnisse

Die anzusetzenden Konzentrationen bezüglich Testkeim und chemischer Beschaffenheit des DIM sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

Tab. 2: DIM-Konzentrationen im Quantitativen Suspensionstest

	Staph. aureus	P. aeruginosa	Strept. faecalis
Aldehyd-Standard	0,4 %	0,6 %	1,7 %
Phenol-Standard	0,05 %	0,5 %	0,015 %
Jodophor-Standard	0,03 %	0,05 %	0,04 %

Für den Aldehyd-Standard galt, daß die anzusetzende Konzentration für Strept. faecalis 2,8 bzw. 4,25mal höher lag als die von P. aeruginosa bzw. Staph. aureus. Bei dem Phenol-Standard war für P. aeruginosa im Vergleich zu Staph. aureus die 10fach, im Vergleich zu Strept. faecalis eine 33,3fach höhere Konzentration erforderlich.

Zur Phenolkonzentration von Staph. aureus sei erwähnt: Zu Beginn dieser Arbeit bereitete uns die Stammkultur dieses Keims bezüglich Wachstum und Phenolresistenz einige Schwierigkeiten, so daß in den Versuchen zur Ermittlung geeigneter Inaktivierungsmedien im Quantitativen Suspensionstest eine Phenolkonzentration von 0,02 % benutzt wurde. Durch mehrmaliges Überimpfen der Stammkultur gelang es, die Resistenz zu heben, so daß die endgültige Konzentration 0,05 % betrug.

Alle 3 Testkeime waren gegenüber dem Jodophor-Standard nahezu gleichmaßen resistent.

5.3.0. Ermittlung geeigneter Inaktivierungsmedien im Quantitativen Suspensionstest und im Bakteriostaseversuch nach den Richtlinien der DGHM.

5.3.1.0 Ermittlung geeigneter Inaktivierungsmedien im Quantitativen Suspensionstest

Die 6 Inaktivierungsmedien teilten wir in 2 Gruppen ein; zu den organischen zählten: TLC, TSHC, TLH, TLH + Na., zu den anorganischen 0,5 % Natriumsulfit und m/20 Phosphatpuffer pH 7.

5.3.1.1 Methodik

Alle 6 Inaktivierungsmittel testeten wir gegen den Aldehyd-Standard für jeden der 3 Testkeime getrennt. Aufgrund der schlechten Ergebnisse für Natriumsulfit und Phosphatpuffer wurden diese beiden Substanzen in den Versuchen mit dem Jodophor- und Phenol-Standard nicht mehr berücksichtigt.

5.3.1.2 Ergebnisse

Abb. 3 zeigt die Ergebnisse für den Ansatz mit dem Aldehyd-Standard. Ein hoher RF bedeutet geringe Neutralisationspotenz und/oder hohe Eigen-toxizität für das geprüfte Inaktivierungsmittel.

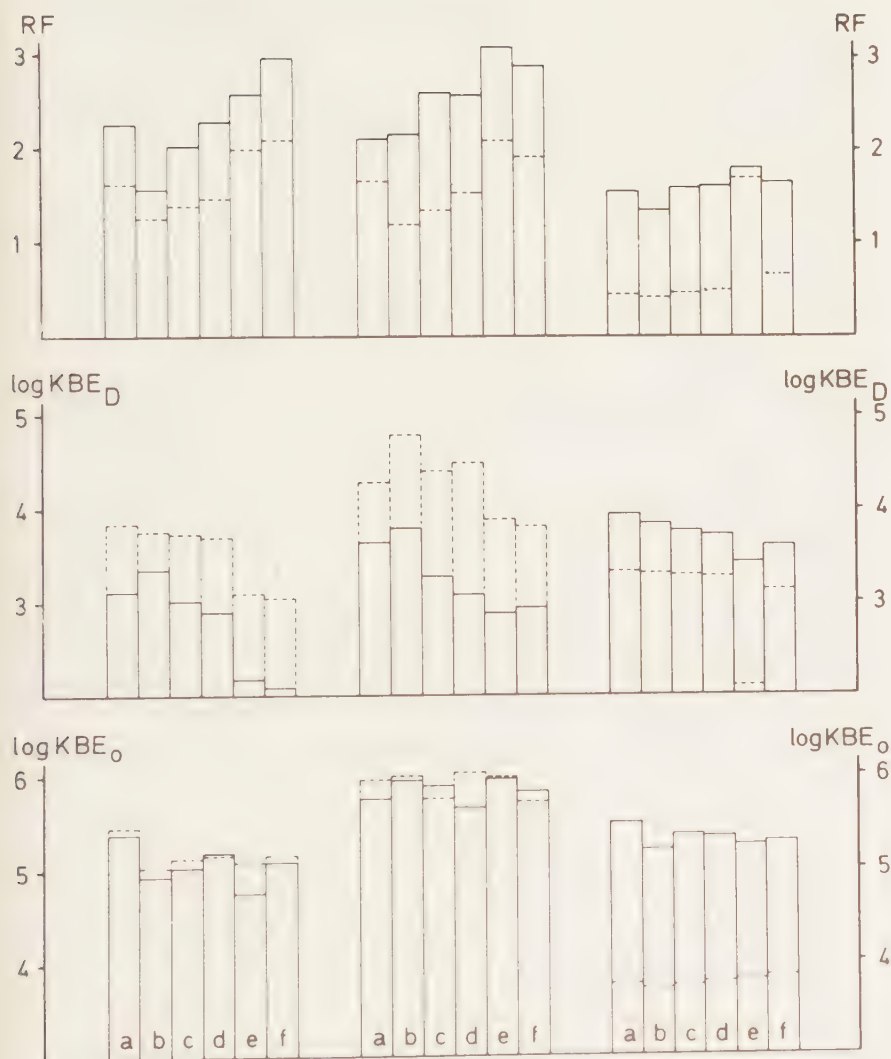


Abb. 3: Ergebnisse des Ansatzes mit dem Aldehyd-Standard. a=TLH, b=TSHC, c=TLH, d=TLH+Na., e=0,5 % Natriumsulfit, f=m/20 Phosphatpuffer. Links die Säulanordnung (RF, log KBE_D, log KBE_O) für Staph. aureus, in der Mitte die für P. aeruginosa, rechts die für Strept. faecalis. Konzentrationen, Keimzahlen, Streubereiche der log KBE_O:

	Staph. aureus	P. aeruginosa	Strept. faecalis
Aldehydkonz. (%)	0,4 (0,4)	0,6 (0,4)	1,7 (1,7)
Keimzahl (x 10 ⁸ /ml)	0,7 (0,7)	6 (8)	0,8 (0,9)
Streubereich log KBE _O	4,75-5,39 (5,02-5,46)	5,56-5,97 (5,73-6,03)	5,2-5,5 (3,71-3,84)

Aus Tab. 3 sind die Differenzen der RF zwischen den beiden anorganischen und den 4 organischen Inaktivierungsmitteln im Versuch mit dem Aldehyd-Standard zu entnehmen.

Tab.3: Differenzen der RF zwischen den beiden anorganischen und den 4 organischen Inaktivierungsmedien

	- RF TLC	- RF TSHC	- RF TLH	- RF TLH + Na.
<i>Staph. aureus</i>				
RF Na_2SO_3	0,31 (0,38)	1,01 (0,73)	0,56 (0,62)	0,29 (0,53)
RF Phosphatp.	0,71 (0,48)	1,41 (0,83)	0,96 (0,72)	0,69 (0,63)
<i>P. aeruginosa</i>				
RF Na_2SO_3	0,99 (0,65)	0,95 (1,19)	0,49 (1,12)	0,52 (0,73)
RF Phosphatp.	0,79 (0,59)	0,75 (1,13)	0,29 (1,06)	0,32 (0,67)
<i>Strept. faecalis</i>				
RF Na_2SO_3	0,26 (1,26)	0,46 (1,28)	0,22 (1,24)	0,2 (1,19)
RF Phosphatp.	0,12 (0,26)	0,32 (0,28)	0,08 (0,24)	0,06 (0,19)

Abb. 3 und Tab. 3 weisen aus, daß die beiden anorganischen Inaktivierungsmittel verglichen mit den 4 organischen Medien für alle Testkeime bezüglich des Aldehyd-Standards geringere Neutralisationswirkung und/oder höhere Eigentoxizität besaßen.

Die Abb. 4 und 5 zeigen die Testansätze mit dem Phenol- und Jodophor-Standard.

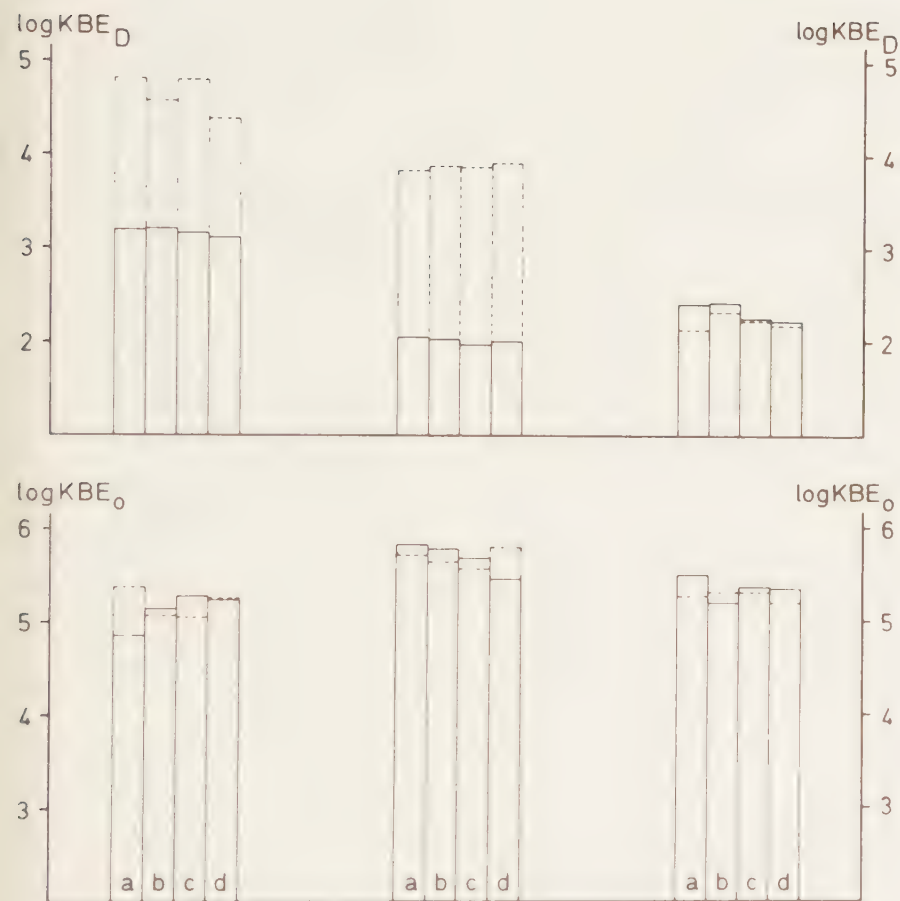


Abb. 4: Ergebnisse der $\log KBE_D$ und $\log KBE_O$ für den Ansatz mit dem Phenol-Standard. a=TLG, b=TSHC, c=TLH, d=TLH+Na.. Konzentrationen, Keimzahlen, Streubereiche der $\log KBE_O$:

	Staph. aureus	P. aeruginosa	Strept. faecalis
Phenolkonz. (%)	0,02 (0,02)	0,5 (0,5)	0,015 (0,015)
Keimzahl ($\times 10^8$ /ml)	0,2 (1)	8,2 (5,9)	1 (1,1)
Streubereich $\log KBE_O$	4,75-5,26 (5,05-5,37)	5,46-5,83 (5,56-5,78)	5,2-5,5 (5,19-5,31)

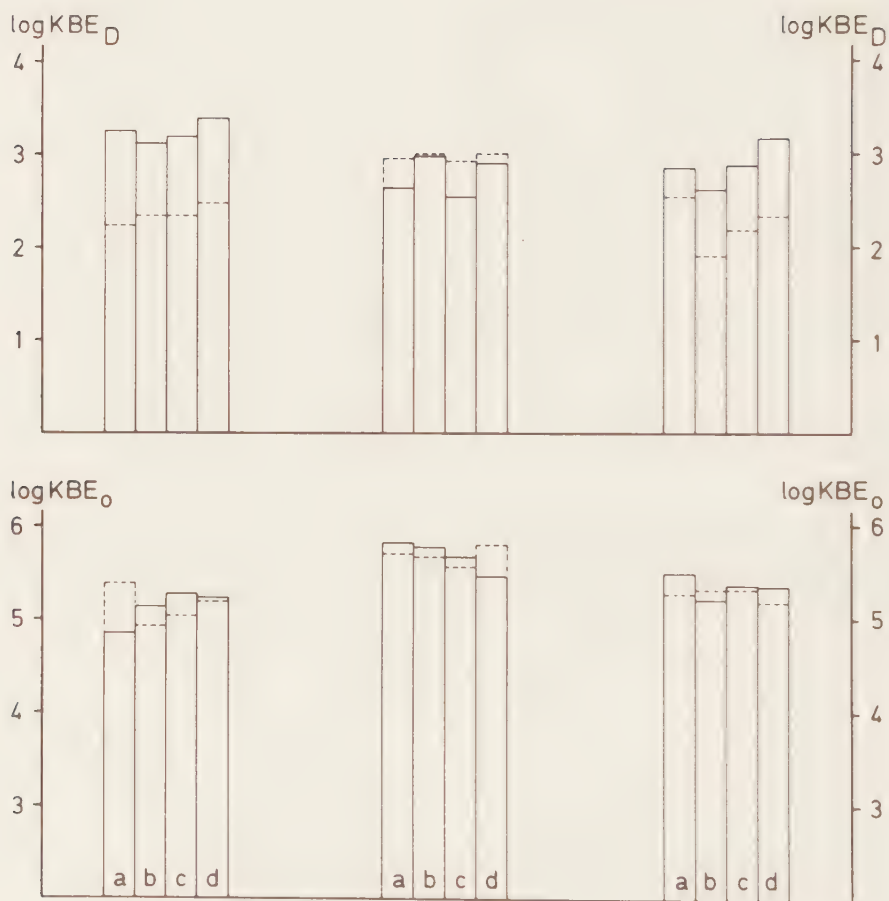


Abb. 5: Ergebnisse der $\log KBE_D$ und $\log KBE_O$ für den Ansatz mit dem Jodophor-Standard. a=TLC, b=TSHC, c=TLH, d=TLH+Na.. Konzentrationen, Keimzahlen, Streubereiche der $\log KBE_O$:

	Staph. aureus	P. aeruginosa	Strept. faecalis
Jodophorkonz. (%)	0,03 (0,03)	0,05 (0,05)	0,04 (0,04)
Keimzahlen ($\times 10^8$ /ml)	0,2 (1)	8,2 (4)	1 (1,1)
Streubereich $\log KBE_O$	4,85-5,26 (4,94-5,39)	5,67-5,84 (5,57-5,78)	5,2-5,5 (5,19-5,31)

Aus Abb. 3, 4 und 5 ist ersichtlich, daß zwischen den 4 organischen Kombinationen bezüglich ihrer Inaktivierungspotenz und/oder ihrer Eigentoxizität nur sehr geringe Unterschiede bestanden. Um die Tendenz für die optimale keim- und desinfektionsmittelspezifische Eignung eines der Inaktivierungsmedien ermitteln zu können, verglichen wir die $\log KBE_D$ miteinander. Dieser Vergleich wurde aus folgendem Grund dem Vergleich der Reduktionsfaktoren in diesem Fall vorgezogen:

Der RF ist die Differenz zwischen $\log KBE_0$ und $\log KBE_D$. Die zum Teil technisch bedingte Streuung der $\log KBE_0$ beeinflusst somit auch die RF, was bei erheblichen Unterschieden der RF allerdings nicht ins Gewicht fällt. Bei geringen Differenzen der RF, wie beim Vergleich der 4 organischen Inaktivierungskombinationen untereinander, wird das Bild durch die Streuung der $\log KBE_0$ etwas verfälscht. Werden dagegen die $\log KBE_D$ miteinander verglichen, so geht die Streuung der $\log KBE_0$ nicht in das Ergebnis mit ein. Dies ist zulässig, weil alle 3 Werte ($\log KBE_D$, $\log KBE_0$, RF) in ein und demselben Versuchsansatz ermittelt wurden.

Die nachfolgenden Tabellen zeigen die Differenzbeträge, die dadurch ermittelt wurden, daß wir vom $\log KBE_D$ des jeweils optimalen Inaktivierungsmediums die $\log KBE_D$ der anderen organischen Testsubstanzen subtrahierten. Die Ergebnisse der zum Teil mehrfachen Reproduktionen stehen in Klammer.

Tab.4: Differenzen der $\log KBE_D$ zwischen dem jeweils optimalen und den anderen 3 organischen Inaktivierungsmitteln für den Aldehyd-Standard

Staph. aureus	- $\log KBE_D$ TLC	- $\log KBE_D$ TLH	- $\log KBE_D$ TLH + Na.
$\log KBE_D$ TSHC	0,24 (-0,08;0,03)	0,34 (0,01;0,31)	0,46 (0,06;0,23)
P. aeruginosa	- $\log KBE_D$ TLC	- $\log KBE_D$ TLH	- $\log KBE_D$ TLH + Na.
$\log KBE_D$ TSHC	0,16 (0,51;0,24)	0,52 (0,39;0,07)	0,72 (0,3;0,28)
Strept. faecalis	- $\log KBE_D$ TSHC	- $\log KBE_D$ TLH	- $\log KBE_D$ TLH + Na.
$\log KBE_D$ TLC	0,1 (0,02)	0,18 (0,03)	0,21 (0,04)

Unter Berücksichtigung aller Reproduktionen erwiesen sich TSHC bei Staph. aureus und P. aeruginosa und TLC bei Strept. faecalis als leicht überlegen.

Tab. 5: Differenzen der $\log KBE_D$ zwischen dem jeweils optimalen und den 3 anderen organischen Inaktivierungsmitteln für den Phenol-Standard

Staph. aureus

	- $\log KBE_D$ TLC	- $\log KBE_D$ TLH	- $\log KBE_D$ TLH + Na.
$\log KBE_D$ TSHC	0,01 (-0,25;0,67)	0,04 (-0,23;0,41)	0,09 (0,18;0,35)

P. aeruginosa

	- $\log KBE_D$ TLC	- $\log KBE_D$ TSHC	- $\log KBE_D$ TLH
$\log KBE_D$ TLH + Na.	- 0,05 (0,08)	- 0,03 (0,04)	0,03 (0,05)

Strept. faecalis

	- $\log KBE_D$ TLC	- $\log KBE_D$ TLH	- $\log KBE_D$ TLH + Na.
$\log KBE_D$ TSHC	0,01 (0,19)	0,17 (0,1)	0,19 (0,15)

Bei Staph. aureus und Strept. faecalis konnten TSHC und bei P. aeruginosa TLH + Na. als optimale Inaktivierungskombinationen des Phenol-Standards ermittelt werden.

Tab. 6: Differenzen der $\log KBE_D$ zwischen dem jeweils optimalen und den 3 anderen organischen Inaktivierungsmitteln für den Jodophor-Standard

Staph. aureus

	- $\log KBE_D$ TLC	- $\log KBE_D$ TSHC	- $\log KBE_D$ TLH
$\log KBE_D$ TLH + Na.	0,14 (0,24)	0,28 (0,14)	0,2 (0,14)

P. aeruginosa

	- $\log KBE_D$ TLC	- $\log KBE_D$ TLH	- $\log KBE_D$ TLH + Na.
$\log KBE_D$ TSHC	0,34 (0,03)	0,44 (0,07)	0,09 (0,0)

Strept. faecalis

	- $\log KBE_D$ TLC	- $\log KBE_D$ TSHC	- $\log KBE_D$ TLH
$\log KBE_D$ TLH + Na.	0,31 (-0,21;0,03)	0,53 (0,43;0,04)	0,28 (0,15;0,09)

Für die Inaktivierung des Jodophor-Standards zeigte sich, daß mit TLH + Na. bei Staph. aureus und Strept. faecalis und mit TSHC bei P. aeruginosa die besten Resultate erzielt werden konnten.

Tab. 7 zeigt zusammenfassend die Inaktivierungsmittel, die sich keim- und desinfektionsmittelspezifisch als geeignet erwiesen. Es muß nochmals darauf hingewiesen werden, daß bei den 4 organischen Inaktivierungsmitteln nur Tendenzen ermittelt werden konnten, während die beiden anorganischen Substanzen aufgrund ihres geringeren DIM-Neutralisationsvermögens und/oder ihrer höheren Keimtoxizität den 4 organischen Medien deutlich unterlegen waren.

Tab. 7: Optimale Inaktivierungskombinationen im Quantitativen Suspensionstest

	Staph. aureus	P. aeruginosa	Strept. faecalis
Aldehyd-Standard	TSHC	TSHC	TLC
Phenol-Standard	TSHC	TLH + Na.	TSHC
Jodophor-Standard	TLH + Na.	TSHC	TLH + Na.

Die aufgrund dieser Zusammenstellung als geeignet ermittelten Inaktivierungsmedien wurden in den nachfolgenden Quantitativen Suspensionstests für den jeweiligen Testkeim und das jeweilige DIM weiter verwendet.

Vergleicht man die Höhen der Säulen in den Abb. 3, 4 und 5 ($\log KBE_D$, RF) eines kompletten Versuchsansatzes (für Aldehyd 6 Säulen; für Phenol und Jodophor jeweils 4 Säulen) mit dem Höhenniveau der entsprechenden Reproduktion, so ergeben sich teilweise beträchtliche Unterschiede. Das liegt einerseits daran, daß in den Reproduktionen in einzelnen Fällen niedrigere DIM-Konzentrationen benutzt wurden. Andererseits waren die Konzentrationen so gewählt worden, daß in einem engen Grenzbereich zwischen DIM-Unwirksamkeit und kompletter Abtötung durch das DIM gearbeitet wurde. Geringe methodische Fehler, wie z. B. ungenaues Pipettieren, ergeben dann zum Teil erhebliche Differenzen in den Höhenniveaux zwischen Versuch und Reproduktion. Trotz methodischer Schwankungen blieben jedoch die Unterschiede zwischen den RF bzw. $\log KBE_D$, bedingt durch die differenten Eigenschaften der einzelnen Inaktivierungsmittel, innerhalb eines Versuchsansatzes in einem engen Bereich konstant. Diese Differenzen sind entscheidend für die Ermittlung geeigneter Inaktivierungsmittel, sofern sie auch in den Reproduktionen nachweisbar sind.

5.3.2.0 Ermittlung geeigneter Inaktivierungsmedien im Bakteriofästaseversuch nach den Richtlinien der DGM unter Berücksichtigung zweier verschiedener Nährmedien

Die im Quantitativen Suspensionstest untersuchten 6 Inaktivierungsmedien wurden im Bakteriofästaseversuch gegen die β DIM-Standards und die β Testkeime geprüft. Als Nährmedien dienten CSL und Standard-1-Bouillon (B).

5.3.2.1 Methodik

Vorkultur: Staph. aureus, P. aeruginosa: 24 Std. / 37°C in CSL à 10 ml.
Strept. faecalis: 72 Std. / 37°C in CSL à 10 ml.

Überimpft wurde die 1 : 10 mit CSL verdünnte Kultur.

Versuchsdurchführung:

Zu sterilen Röhrchen, gefüllt mit 5 ml doppelt konzentriertem Inaktivierungsmittel in CSL bzw. Standard-1-Bouillon, gaben wir je 5 ml der frisch mit SHW angesetzten DIM-Standard-Lösung. Nach ausgebligtem Durchmischen auf einem Schüttelmixer erfolgte die Beimpfung mit jeweils 0,1 ml der 1 : 10 mit CSL verdünnten Keimsuspension (1).

Auswertung:

Die Durchmusterung der Röhrchen auf wachstumstrübung erfolgte bei Staph. aureus und P. aeruginosa nach 72 Std. Inkubation bei 37°C . Zur Keimspezifizierung wurden vereinzelt Subkulturen auf CSA-Platten angelegt. Wegen der unsicheren Trübungsbeurteilung bei den Versuchsansätzen mit Strept. faecalis wurden hier nach 5 Tagen Inkubation bei 37°C von jedem Röhrchen Subkulturen auf CSA-Platten angelegt, die wir nach 72 Std. / 37°C auf Wachstum kontrollierten.

Abb. 6 veranschaulicht den Versuchsablauf.

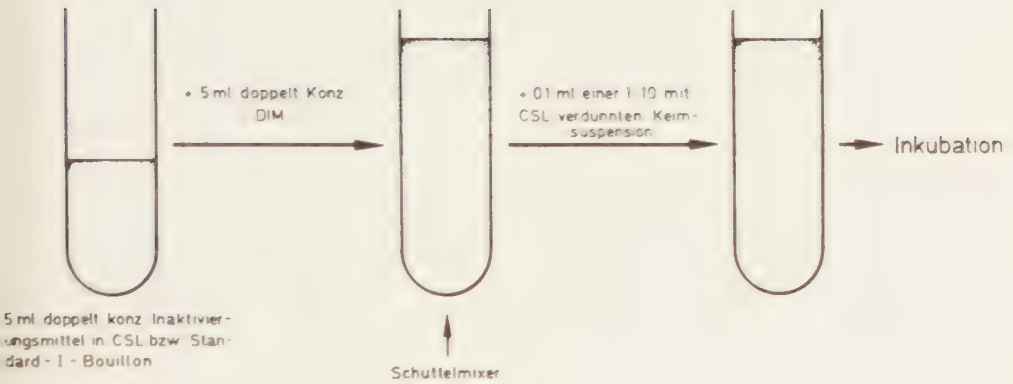


Abb. 6: Ablauf des Bakteriostaseversuchs nach den Richtlinien der DGHM

5.3.2.2 Ergebnisse

Aus den Tab. 8, 9 und 10 sind die Ergebnisse der Bakteriostaseversuche zu entnehmen. Die Ergebnisse der Reproduktionen sind berücksichtigt worden. Wachstum ist durch +, kein Wachstum durch - gekennzeichnet.

Tab. 9: Ergebnisse des Bakteriotasterversuchs mit dem Phenol-Standard

	Staph. aureus												P. aeruginosa												Strept. faecalis												
	CSL						Bouillon						CSL						Bouillon						CSL						Bouillon						
	2,0	1,5	1,25	1,0	0,75	0,0125	2,5	2,0	1,5	1,25	1,0	0,75	0,5	0,375	12,5	10,0	7,5	5,0	1,0	0,75	0,5	0,375	25,0	12,5	10,0	7,5	0,75	0,5	0,375	3,75	2,5	2,0	1,5	0,025	0,0125	0,00625	0,003125
TLC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
TSHC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
TLH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
TLH+Na.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
0,5 % Na ₂ SO ₃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
m/20 Phosphat.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Folgende DIM-Grenzkonzentrationen konnten bei den 3 Testkeimen festgestellt werden.

Tab. 11: DIM-Grenzkonzentrationen im Bakterio-
staseversuch

	Staph. aureus	P. aeruginosa	Strept. faecalis	
Aldehyd-Standard	0,375 % 0,375 %	1,0 % 1,5 %	0,75 % 0,75 %	CSL B
Phenol-Standard	1,5 % 2,0 %	10,0 % 12,5 %	2,5 % 2,5 %	CSL B
Jodophor-Standard	2,5 % 2,5 %	3,75 % 3,75 %	3,75 % 3,75 %	CSL B

Als optimal, bezogen auf Testkeim und DIM, gilt das Inaktivierungsmedium, welches verglichen mit den anderen getesteten Substanzen bei der höchsten DIM-Konzentration noch Keimwachstum erlaubt.

Tab. 12: Optimale Inaktivierungsmedien im Bakterio-
staseversuch

	Staph. aureus	P. aeruginosa	Strept. faecalis	
Aldehyd-Standard	0,5 % Na_2SO_3 0,5 % Na_2SO_3	0,5 % Na_2SO_3 0,5 % Na_2SO_3	0,5 % Na_2SO_3 0,5 % Na_2SO_3	CSL B
Phenol-Standard	TSHC/TLH/TLH+Na. TLH	TSHC TSHC	TSHC TSHC/TLH/TLH+Na.	CSL B
Jodophor-Standard	TLH+Na. TLH+Na.	TLH+Na. TLH+Na.	TLH+Na. TLH+Na./TSHC	CSL B

0,5 % Natriumsulfit erwies sich demnach als Inaktivierungsmedium für Aldehyd bei allen 3 Keimen verglichen mit den anderen 5 getesteten Substanzen als eindeutig überlegen. Die Inaktivierungspotenz von 0,5 % Natriumsulfit und m/20 Phosphatpuffer war dagegen für den Phenol- und Jodophor-Standard bei allen 3 Keimen geringer als die der 4 organischen Medien. Nur kleine Unterschiede ergaben sich beim Vergleich der 4 organischen Mittel bezogen auf alle DIM und Keime.

Insgesamt ist festzustellen, daß erhebliche Unterschiede zwischen den ermittelten Ergebnissen im Quantitativen Suspensionstest und denen im Bakterio-
staseversuch bestanden.

5.4.0 Vergleichende Untersuchung des Einflusses von 3 Keimsuspensionsmedien auf die Rückgewinnungsrate und/oder die Keimresistenz im Quantitativen Suspensionstest

Gegen die 3 DIM und die 3 Testkeime wurden folgende Suspensionsmedien miteinander verglichen:

CSL: pH 7,3 $\pm 0,1$

NaCl: pH 6,2

VF: pH 7,0 $\pm 0,1$

5.4.1 Methodik

Nach Vorkultur in CSL, wie unter 5.1.1 beschrieben, wurden 8 ml der Kultur bei 3000 g während 15 Min. zentrifugiert. Nach Abschütten des klaren Überstandes erfolgte gründliche Durchmischung mit einem Schüttelmixer in 5 ml des jeweiligen Suspensionsmediums. Danach erneute Zentrifugation mit 3000 g während 15 Min.. Diesen Vorgang wiederholten wir insgesamt 3 mal. 30 Min. und 5 Std. nach dem letzten Waschvorgang wurden mit den gleichen Suspensionen Quantitative Suspensionstests durchgeführt. Der DIM-Ansatz erfolgte kurz vor der Testung bei 30 Min., blieb dann aber bis zu dem Versuch bei 5 Std. verschlossen stehen. Als Inaktivierungsmedien dienten die unter 5.3.1.2 ermittelten Substanzen.

5.4.2 Ergebnisse

In Abb. 7 sind die Ergebnisse des Versuchs mit dem Aldehydstandard dargestellt.

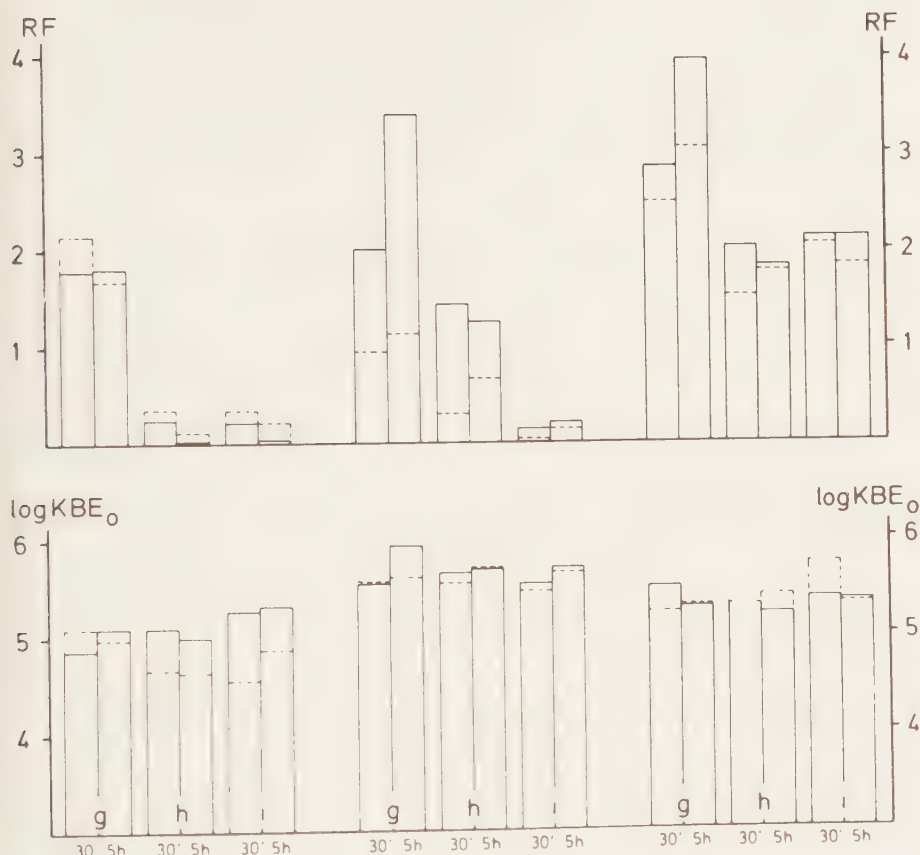


Abb. 7: Ergebnisse des Versuchs mit dem Aldehyd-Standard. RF und $\log KBE_0$ eines Suspensionsmediums sind als Doppelsäule gekennzeichnet, wobei die erste einer Keimverweildauer in der Suspension von 30 Min., die zweite einer von 5 Std. entspricht. g=CSL, h=NaCl, i=VF. Links die Säulenordnung für Staph. aureus, in der Mitte die für P. aeruginosa, rechts die für Strept. faecalis. Konzentrationen, Keimzahlen, Inaktivierungsmittel:

	Staph. aureus	P. aeruginosa	Strept. faecalis
Aldehydkonz. $g(\%)$	0,4 (0,4)	0,6 (0,5)	1,7 (1,7)
Keimzahl ($\times 10^8/ml$)			
CSL 30'	1 (0,6)	7,8 (2)	7 (2)
5 h	1 (0,7)	8,3 (2)	3,9 (1)
NaCl 30'	0,2 (1,5)	4,2 (4)	4,2 (1)
5 h	0,6 (0,4)	2,2 (2)	1,2 (1,3)
VF 30'	0,7 (2)	6,2 (5)	2,9 (0,5)
5 h	0,2 (3)	2,3 (4)	0,5 (2)
Inakt.- Mittel	TSHC	TSHC	TLC

Die $\log KBE_0$ lagen für alle Testkeime in einem Bereich zwischen 4,56 und 5,94; die ermittelten RF unterschieden sich dagegen erheblich.

Bildet man die Differenzen der RF nach Suspension in CSL mit denen nach Suspension in NaCl und VF, so ergeben sich die in Tab. 13 dargestellten Unterschiede. Die RF gleicher Keimverweildauer in Suspension werden nur miteinander verglichen.

Tab. 13: Differenzen der RF nach Suspension in CSL und denen nach Suspension in NaCl und VF für den Aldehyd-Standard

	Staph. aureus				P. aeruginosa				Strept. faecalis			
	- RF NaCl		- RF VF		- RF NaCl		- RF VF		- RF NaCl		- RF VF	
	30'	5 h	30'	5 h	30'	5 h	30'	5 h	30'	5 h	30'	5 h
RF CSL	1,55 (1,8)	1,8 (1,57)	1,56 (1,81)	1,83 (1,47)	0,56 (0,65)	2,15 (0,47)	1,87 (0,91)	3,2 (1,0)	0,84 (0,98)	2,14 (1,28)	0,72 (0,44)	1,83 (1,21)

Für alle Testkeime wurden nach Suspension in CSL höhere RF ermittelt als nach Suspension in NaCl und VF. Die RF nach Suspension in NaCl und VF lagen für Strept. faecalis und Staph. aureus auf etwa gleicher Höhe, während für P. aeruginosa der RF nach Suspension in NaCl einen höheren Betrag aufwies als der nach Suspension in VF.

Vergleicht man die RF nach 30 Min. mit denen nach 5 Std. für jedes Suspensionsmedium und jeden Keim, so können in dem Versuch mit dem Aldehyd-Standard diesbezüglich keine klaren Aussagen getroffen werden, weil der Versuch und die dazugehörige Reproduktion in dieser Hinsicht oftmals nicht übereinstimmen.

Aus der Abb. 8 sind die Versuchsergebnisse des Ansatzes mit dem Phenol-Standard zu entnehmen.

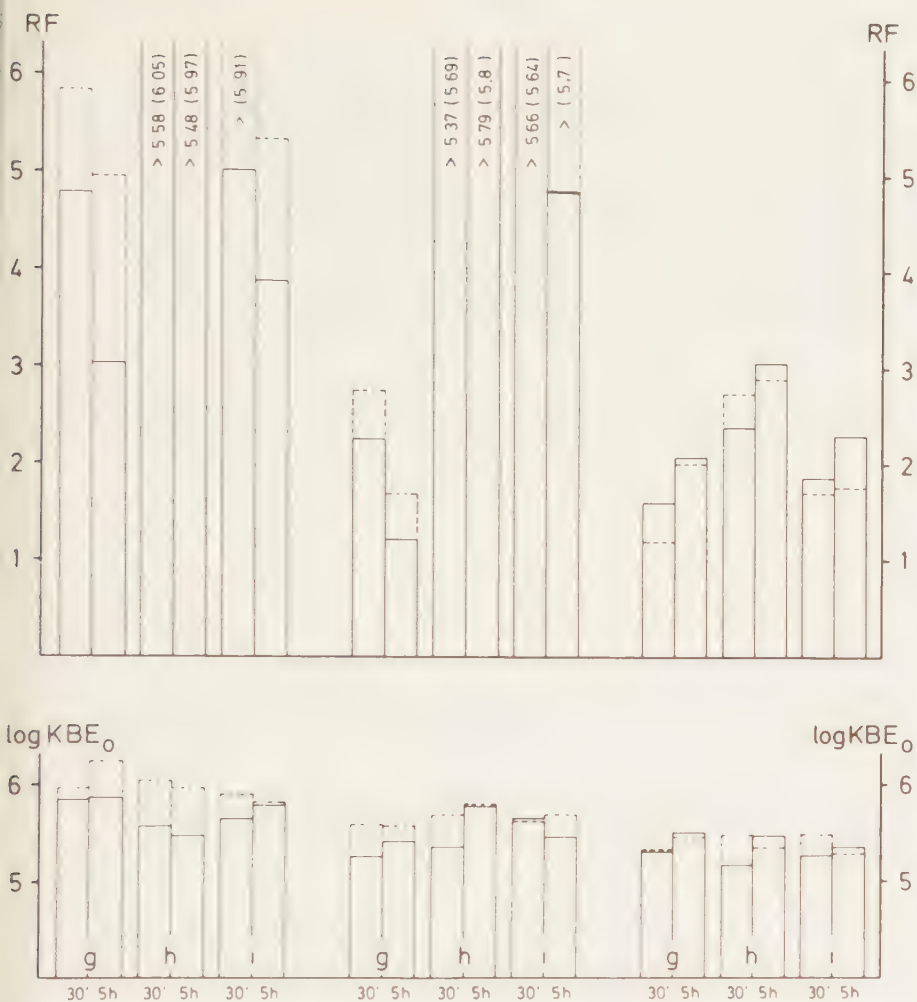


Abb. 8: Ergebnisse des Versuchs mit dem Phenol-Standard. Ergibt sich in der Nachkultur kein Wachstum, so gilt, daß der RF größer als der entsprechende log KBE₀ ist. Konzentrationen, Keimzahlen, Inaktivierungsmittel:

	Staph. aureus	P. aeruginosa	Strept. faecalis
Phenolkonz. (%)	0,05 (0,07)	0,5 (0,5)	0,015 (0,015)
Keimzahl (x 10 ⁸ /ml)			
CSL 30'	3 (12)	3 (2)	7 (2)
5 h	3 (14)	11,6 (2)	3,9 (1)
NaCl 30'	2,4 (6)	1 (2,5)	4,2 (1)
5 h	4,8 (7)	1,4 (2)	1,2 (1,3)
VF 30'	1,6 (6)	1,3 (5)	2,9 (0,5)
5 h	4,2 (9)	3 (4)	0,5 (2)
Inakt.-Mittel	TSHC	TLH+Na.	TSHC

Die $\log_{10} \text{ABE}_0$ lagen bei den Testkeimen in einem Bereich zwischen 5,16 und 6,15.

Bei Staph. aureus konnte nach Suspension in NaCl kein Wachstum nachgewiesen werden: $\text{RF} > 5,58$ bzw. $> 5,48$ ($> 6,05$ bzw. $> 5,97$).

Nach Suspension in VF trat in der Reproduktion nach 30 Min. Keimverweildauer ebenfalls kein Wachstum auf. Werden von den RF nach Suspension in VF die entsprechenden RF nach Suspension in CSL subtrahiert, so ergeben sich die in Tab. 14 dargestellten Unterschiede.

Tab. 14: Differenzen zwischen den RF nach Suspension in VF und denen nach Suspension in CSL für Staph. aureus

		- RF CSL
		30' 5 h
RF VF	0,23	0,85
		(0,38)

Bei P. aeruginosa war nach Suspension in CSL deutliches Wachstum in der Nachkultur zu verzeichnen. Nach Suspension in NaCl dagegen trat kein Wachstum auf: $\text{RF} > 5,37$ bzw. $> 5,79$ ($> 5,69$ bzw. $> 5,8$). Nach Suspension in VF konnten wir nur einmal nach 5 Std. Keimverweildauer Wachstum in der Nachkultur feststellen.

Aus der Tab. 15 sind die Differenzbeträge für Strept. faecalis zu entnehmen, die dadurch ermittelt wurden, daß vom RF nach Suspension in NaCl die RF nach Suspension in CSL und VF subtrahiert wurden.

Tab. 15: Differenzen der RF nach Suspension in NaCl und denen nach Suspension in CSL und VF für Strept. faecalis

		- RF CSL			- RF VF
		30' 5 h			30' 5 h
RF NaCl	0,78	0,98	0,53	0,75	
	(1,55)	(0,89)			(1,13)

Bei Strept. faecalis fanden wir nach Suspension in CSL die niedrigsten RF, es folgten die nach Suspension in VF, am höchsten waren die RF nach Suspension in NaCl.

Zusammenfassend kann für den Ansatz mit dem Prendol-Standard festgestellt werden: Nach Suspension in CSL konnten für alle Testkeime niedrigere RF verzeichnet werden als nach Suspension in NaCl. Eine Mittelstellung nahmen die RF nach Suspension in VF ein.

Während bei *Strept. faecalis* und *Staph. aureus* die Unterschiede zwischen den RF nach Suspension in CSL und VF in etwa gleich waren, konnten für *P. aeruginosa* große Differenzen zwischen den RF nach Suspension in CSL und VF ermittelt werden.

Der Vergleich der RF nach 30 Min. Verweildauer mit denen nach 5 Std. ergab für *Staph. aureus* und *P. aeruginosa* ein ähnliches Bild: Die RF nach 5 Std. waren nach Suspension in CSL und VF geringer als die nach 30 Min.. Für *Strept. faecalis* jedoch lagen die RF nach 5 Std. bei allen Suspensionsmedien höher als die nach 30 Min..

In Abb. 9 sind die Ergebnisse des Ansatzes mit dem Jodophor-Standard dargestellt.

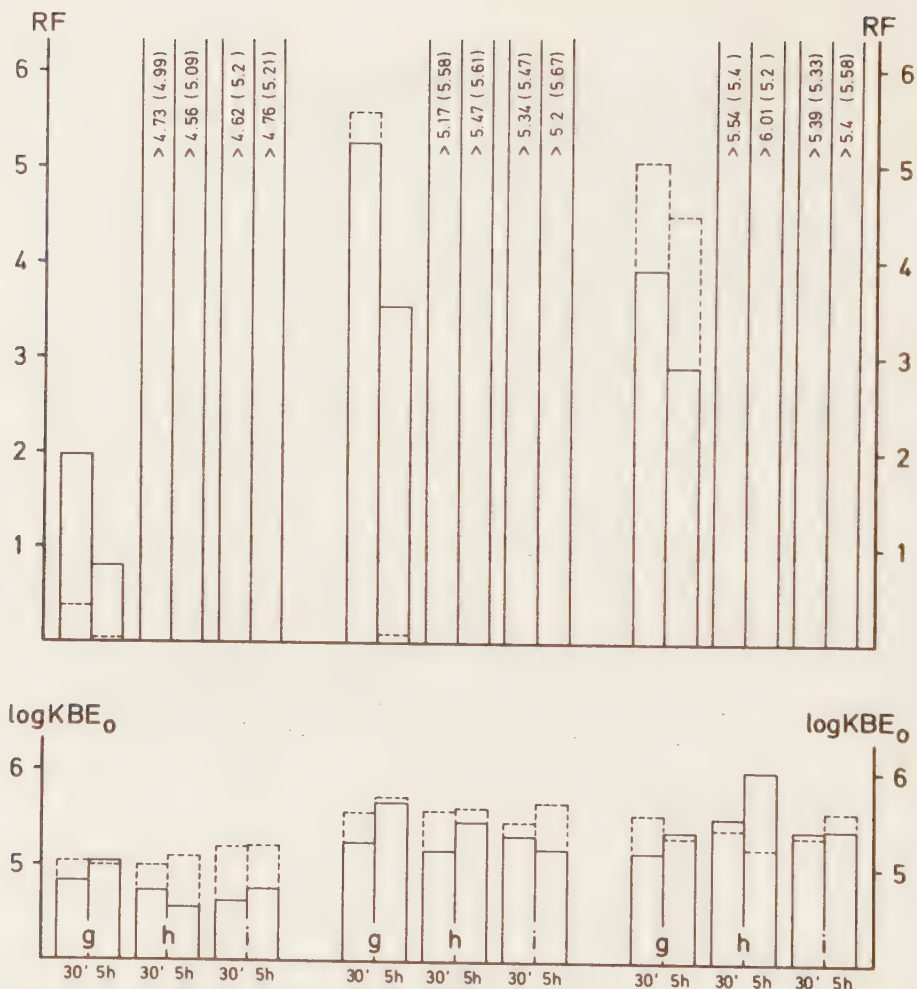


Abb. 9: Ergebnisse des Versuchs mit dem Jodophor-Standard. Konzentrationen, Keimzahlen, Inaktivierungsmittel:

		Staph. aureus	P. aeruginosa	Strept. faecalis
Jodophorkonz. (%)		0,03 (0,03)	0,05 (0,05)	0,04 (0,04)
Keimzahl (x 10 ⁶ /ml)				
CSL	30'	1 (0,6)	3 (2)	2 (7)
	5 h	1 (1)	12 (2)	1 (5)
NaCl	30'	0,2 (1)	1 (2,5)	1 (2)
	5 h	0,6 (0,4)	1,4 (2)	1,3 (1)
VF	30'	0,7 (2)	1,3 (4)	0,5 (1,2)
	5 h	0,2 (3)	3 (5)	2 (0,5)
Inakt.-Mittel		TLH+Na.	TSHC	TLH+Na.

Aus der Abb. 9 ist ersichtlich, daß die $\log KBE_0$ aller Testkeime in einem Bereich zwischen 4,56 und 6,01 lagen.

Wurden die Testkeime in NaCl und VF suspendiert und der entsprechenden Jodophorkonzentration über 10 Min. ausgesetzt, so konnte in den Nachkulturen kein Wachstum nachgewiesen werden, während nach Suspension in CSL bei allen Testkeimen noch deutliches Wachstum auftrat.

Weiterhin fällt auf, daß die RF der Testkeime (Suspensionsmedium CSL) nach 5 Std. Verweildauer deutlich niedriger ausfielen als die nach 30 Min.. In diesem Fall war zu klären, ob dieses Verhalten durch eine Resistenzerrhöhung der Testkeime verursacht war, oder ob die bakterizide Wirksamkeit der angesetzten Jodophorkonzentrationen innerhalb von 5 Std. abgenommen hatte.

5.5.0 Chemischer Nachweis von freiem, molekularem Jod in einer 0,1 %igen Jodophor-Standardlösung

Da die bakterizide Wirkung einer Jodophorlösung vorwiegend von der Konzentration an freiem Jod abhängt, wurde ein chemischer Nachweis von freiem, in Lösung befindlichem Jod durchgeführt.

5.5.1 Methodik

Gibt man zu einer freien Jod enthaltenden Lösung Chloroform, so erhält man einen stabilen, violetten Jod-Chloroformkomplex, dessen Farbintensität von der Konzentration an freiem Jod abhängig ist. Zum Zeitpunkt 0 wurde eine 0,1 %ige Jodophorstammlösung angesetzt. Zu 5 ml dieser Lösung gaben wir 5 ml Chloroform und bestimmten die Extinktion des violetten Jod-Chloroformkomplexes bei 546 nm im Eppendorf-Photometer gegen reines Chloroform. Der gleiche Vorgang wurde mit der verschlossenen Jodophorstammlösung nach 3,5 und 7 Std. wiederholt.

5.5.2 Ergebnis

Das Ergebnis ist in Abb. 10 dargestellt.

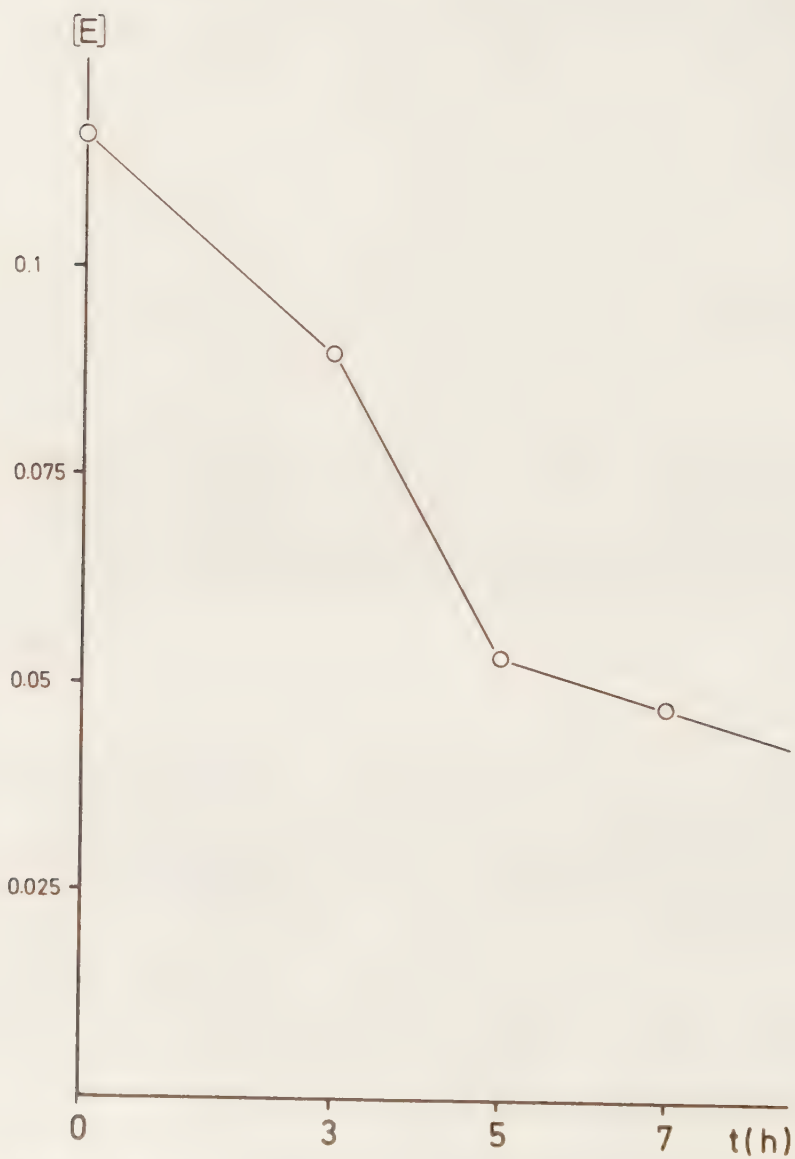


Abb.10: Veränderung der Extinktion des Jod-Chloroform-Komplexes über die Zeit.

Man erkennt eine deutliche, nicht lineare Abnahme der freien Jodkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit. Der hohe Dampfdruck des freien Jods verursacht seine rasche Flüchtigkeit in Lösung.

5.6.0 Vergleichende Untersuchung des Einflusses von 4 Vorkulturmedien auf die Keimresistenz im Quantitativen Suspensionstest

Als Vorkulturmedien dienten:

CSA-Nährböden (20 ml, Ø 9 cm)

Brain-Heart-Infusion-Agar (BHI-A, 20 ml, Ø 9 cm)

CSL à 10 ml

Standard-I-Bouillon (B) à 10 ml

Die Inkubationszeit betrug für *P. aeruginosa* und *Staph. aureus* 24 Std., für *Strept. faecalis* 72 Std. bei 37° C.

5.6.1 Methodik

Die Kulturen auf den festen Nährböden wurden mit 10 ml CSL abgespatelt. 8 ml davon sowie 8 ml der vorher homogenisierten Kulturen in den flüssigen Nährmedien wurden in Pyrex-Röhrchen für 15 Min. bei 3000 g zentrifugiert. Nach Abschütten des klaren Überstandes erfolgte Resuspension in 5 ml CSL für alle 4 Ansätze und erneute Zentrifugation bei 3000 g für 15 Min.. Dieser Vorgang wurde 3 mal wiederholt. Wegen der verschiedenen Wachstumsgeschwindigkeiten auf den Nährmedien - das Wachstum erfolgte bei allen 3 Testkeimen auf CSA und BHI-A schneller als in den flüssigen Medien - wurden am Ende die Ansätze der Nährböden 1 : 10₉ mit CSL verdünnt, so daß die Keimzahlen aller Ansätze zwischen 10⁷ und 10⁹ KBE/ml lagen. Somit wurden alle auf verschiedenen Nährmedien gezüchteten Keimpopulationen einheitlich in CSL gewaschen. 30 Min. nach Fertigstellung der endgültigen Keimsuspension wurde der Quantitative Suspensionstest mit den entsprechenden Aldehydkonzentrationen und Inaktivierungsmitteln durchgeführt.

5.6.2 Ergebnisse

Die Ergebnisse sind der folgenden Abb. 11 zu entnehmen.

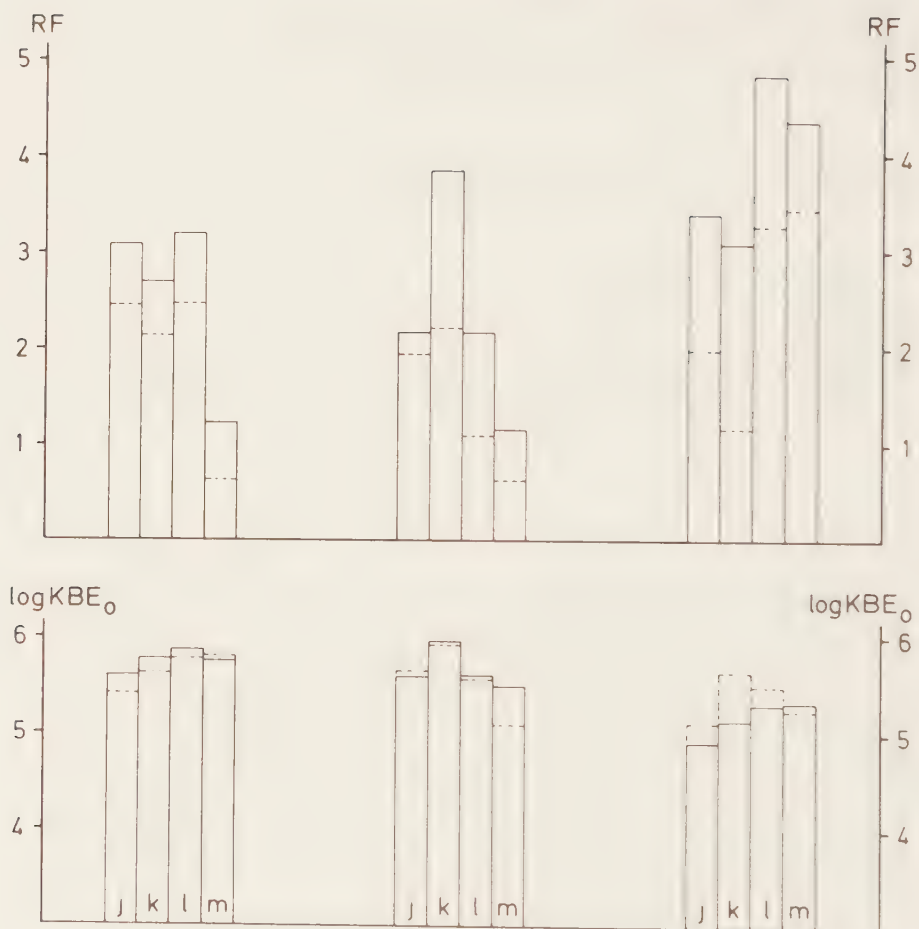


Abb. 11: Versuchsergebnisse. j=CSA, k=BHI-A, l=CSL, m=B. Die Säulenordnung für *Staph. aureus* steht links, die für *P. aeruginosa* in der Mitte, die für *Strept. faecalis* rechts. Aldehydkonzentrationen, Keimzahlen, Inaktivierungsmittel:

	Staph. aureus	P. aeruginosa	Strept. faecalis
Aldehydkonz. (%)	0,4 (0,4)	0,6 (0,6)	1,7 (1,7)
Keimzahl ($\times 10^8/\text{ml}$)			
CSA	4 (2)	5 (5)	1 (0,8)
BHI-A	6 (3)	15 (9)	1,2 (2)
CSL	2 (2)	3,5 (3)	0,7 (2)
B	7 (3)	7,3 (2,5)	1,6 (0,5)
Inakt.-Mittel	TSHC	TSHC	TLC

Die $\log KBE_0$ aller Testkeime lagen in einem Bereich zwischen 4,92 und 5,91; die RF zeigten dagegen erhebliche Unterschiede.

Werden vom RF des Kulturmediums, mit dem die niedrigste, testkeimbezogene Resistenzstufe erzielt wurde, die RF der anderen Kulturmedien subtrahiert, so können folgende Unterschiede ermittelt werden.

Tab. 16: Differenzen zwischen den RF des Mediums mit der niedrigsten, erzeugten Resistenz und denen der anderen Kulturmedien

Staph. aureus

	- RF CSA	- RF BHI-A	- RF B
RF CSL	0,11 (0,02)	0,5 (0,34)	1,96 (1,84)

P. aeruginosa

	- RF CSA	- RF CSL	- RF B
RF BHI-A	1,7 (0,27)	1,7 (1,11)	2,71 (1,58)

Strept. faecalis

	- RF CSA	- RF BHI-A	- RF B
RF CSL	1,43 (1,28)	1,74 (2,09)	0,48 (- 0,17)

Bei Staph. aureus konnte demnach durch Vorkultur in Standard-I-Bouillon die höchste Resistenzstufe gegenüber dem Aldehydstandard erzielt werden; danach folgten BHI-A, CSA und CSL.

Geordnet nach der absteigenden, durch sie erzeugten Resistenzlage bei P. aeruginosa konnte folgende Reihung der 4 Nährmedien ermittelt werden: B, CSL, CSA und BHI-A.

Eine Vorkultur auf BHI-A erzeugte bei Strept. faecalis die höchste Resistenzstufe, danach folgte Züchtung auf CSA; die niedrigste Widerstandskraft wurde durch Kultur in CSL und B erzielt.

5.7.0 Vergleichende Zusammenfassung aller Ergebnisse

5.7.1 DIM-Standardkonzentrationen

Vergleicht man die benötigten Grenzkonzentrationen im Bakteriostaseversuch mit den Konzentrationen, die im Quantitativen Suspensionstest einen RF

zwischen 0,5 und 3,75 erzielten, so ergeben sich folgende Unterschiede: Die im Bakteriostaseversuch anzusetzende Alddehyd-Standardkonzentration lag für *Staph. aureus* geringfügig niedriger, für *P. aeruginosa* um den Faktor 1,66 bzw. 2,5 (CSL, B) höher, für *Strept. faecalis* um den Faktor 2,26 niedriger als die im Quantitativen Suspensionstest.

Die Phenol-Standardkonzentrationen im Bakteriostaseversuch waren für *Staph. aureus* 30 bzw. 26fach (CSL, B), für *P. aeruginosa* 20 bzw. 40fach (CSL, B) und für *Strept. faecalis* 166,67fach höher als die im Quantitativen Suspensionstest.

Im Versuch mit dem Jodophor-Standard lagen die im Bakteriostaseversuch ermittelten Konzentrationen für *Staph. aureus* um den Faktor 63,33, für *P. aeruginosa* um den Faktor 75 und für *Strept. faecalis* um den Faktor 93,75 höher als die im Quantitativen Suspensionstest.

Zusammenfassend zeigt sich, daß die notwendigen Aldehydkonzentrationen im Bakteriostaseversuch niedriger ausfielen als im Quantitativen Suspensionstest, während für die Ansätze mit den Phenol- und Jodophor-Standards erheblich höhere Konzentrationen im Bakteriostaseversuch nach den Richtlinien der DGHM anzusetzen waren.

Weiterhin ergeben sich Unterschiede in den testkeimspezifischen Konzentrationen der 3 DIM beim Vergleich zwischen Bakteriostaseversuch und Quantitativen Suspensionstest:

verhielten sich die Aldehydkonzentrationen im Quantitativen Suspensionstest für *Strept. faecalis*, *P. aeruginosa* und *Staph. aureus* wie 1,7 : 0,6 : 0,4, so galt für den Bakteriostaseversuch 0,75 : 1,0 : 0,375. War bei *Strept. faecalis* im Quantitativen Suspensionstest die nächste Aldehydkonzentration notwendig, so traf dies im Bakteriostaseversuch für *P. aeruginosa* zu.

Für den Phenol-Standard erhielten wir im Quantitativen Suspensionstest für *Strept. faecalis*, *P. aeruginosa* und *Staph. aureus* ein Verhältnis von 0,018 : 0,5 : 0,05 und im Bakteriostaseversuch von 2,5 : 10,0 : 1,5. Im Quantitativen Suspensionstest wurden die niedrigsten Phenolkonzentrationen für *Strept. faecalis* ermittelt im Bakteriostaseversuch für *Staph. aureus*.

Die notwendigen Jodophorkonzentrationen verhielten sich im Quantitativen Suspensionstest wie 0,04 : 0,05 : 0,03 (*Strept. faecalis*, *P. aeruginosa*, *Staph. aureus*) und im Bakteriostaseversuch wie 3,75 : 3,75 : 2,5.

Die im Quantitativen Suspensionstest festgestellten geringen Konzentrationsunterschiede zwischen *Strept. faecalis* und *P. aeruginosa* waren im Bakteriostaseversuch nicht mehr nachweisbar.

5.7.2 Inaktivierungsmedien

Der entscheidende Unterschied zwischen der Ermittlung geeigneter Inaktivierungsmedien mit Hilfe des Bakteriostaseversuchs einerseits und des Quantitativen Suspensionstests andererseits liegt darin, daß 0,5 % Natriumsulfit bei der Neutralisation des Aldehyd-Standards allen anderen Substanzen im Bakteriostaseversuch bei den 3 Testkeimen eindeutig überlegen war, während 0,5 % Natriumsulfit sowie m/20 Phosphatpuffer im Quantitativen Suspensionstest verglichen mit den 4 organischen Substanzen deutlich schlechter abschnitten.

Die Unterschiede zwischen den 4 organischen Inaktivierungskombinationen konnten im Quantitativen Suspensionstest nur tendenzmäßig ermittelt werden. Im Bakteriostaseversuch erwiesen sich ebenfalls oft 2 oder 3 der 4 organischen Mittel zur DIM-Inaktivierung bei einem Testkeim als gleichermaßen geeignet.

Beim Vergleich von TSHC mit den anderen organischen Inaktivierungsmedien zeigte sich, daß diese Kombination im Quantitativen Suspensionstest am häufigsten bei allen DIM und Testkeimen optimal war.

5.7.3 Suspensionsmedien

Durch verschiedene Suspensionsmedien wurde die DIM-Wirksamkeit und/oder die Keimresistenz in einem erheblichen Ausmaß beeinflußt.

Suspensionen in NaCl und VF bewirkten unabhängig von den verschiedenen Eigenschaften der Testkeime ein stärkeres Wachstum in der Nachkultur nach 10-minütiger Einwirkungszeit der Aldehydkonzentrationen verglichen mit dem nach Suspension in CSL erzielten Wachstum.

Durch Vorbehandlung in CSL erhielten wir bei allen Testkeimen nach Einwirkung der Phenolkonzentrationen höheres Wachstum in den Nachkulturen als nach Suspension in NaCl. Die ermittelten RF nach Suspension in VF nahmen hier eine Mittelstellung ein.

Wurden die Mikroorganismen in NaCl und VF suspendiert, so trat nach Einwirkung des Jodophor-Standards kein Wachstum in den Nachkulturen auf; die CSL-Suspensionen zeigten dagegen deutliches Wachstum.

Es waren aber auch testkeimspezifische Unterschiede zu verzeichnen:

Die RF nach Suspension in NaCl und VF lagen im Versuch mit Aldehyd für Staph. aureus und Strept. faecalis etwa auf gleichem Niveau, während die RF nach Suspension in NaCl bei P. aeruginosa deutlich höhere Werte erreichten als die nach Suspension in VF.

Waren die Unterschiede zwischen den RF nach Suspension in CSL und VF für Staph. aureus und Strept. faecalis nach Einwirkung des Phenol-Standards ungefähr gleich, so wurden für P. aeruginosa beim Vergleich der RF nach Suspension in CSL und VF deutlich höhere Differenzen erzielt.

Bezüglich der Keimverweildauer, d. h. Vergleich des 30 Min.- und 5 Std.- Wertes eines Mediums, können im Ansatz mit Aldehyd keine keim- und desinfektionsmittelspezifischen Aussagen gemacht werden, weil zwischen Versuch und Reproduktion in dieser Hinsicht Differenzen auftraten. Für den Phenol-ansatz lassen sich jedoch gewisse Feststellungen, keim- und suspensionsmittelspezifisch, bezüglich der Keimverweildauer treffen:

Für Staph. aureus und P. aeruginosa lag nach Suspension in VF und CSL das Wachstum nach 5 Std. niedriger als das nach 30 Min.. Eine Aussage zur Keimverweildauer nach Suspension in NaCl erübrigt sich, da hier bei beiden Testkeimen sowohl nach 30 Min. als auch nach 5 Std. kein Wachstum auftrat. Im Gegensatz dazu wurde für Strept. faecalis bei Suspension in allen Medien nach 5 Std. höheres Wachstum verzeichnet als nach 30 Min..

Chemisch konnte gezeigt werden, daß die freie Jodkonzentration und damit auch die bakterizide Wirksamkeit einer angesetzten Jodophorlösung mit der Zeit abnimmt; tatsächlich lagen bei allen Testkeimen die RF nach 5 Std. deutlich niedriger als die nach 30 Min.. Dies bezieht sich allerdings nur auf die CSL-Suspensionen, da nach Suspension in VF und NaCl kein Wachstum in der Nachkultur auftrat.

Allen Versuchen ist gemeinsam, daß unabhängig vom gewählten Suspensionsmedium das Wachstum aller Testkeime in den Kontrollansätzen in einem sehr engen Streubereich lag; d. h. durch die Suspensionsmedien selbst konnten keine feststellbaren toxischen Wirkungen auf die Testkeime ausgeübt werden, so daß primär ungeschädigte Mikroorganismen zu den DIM-Ansätzen kamen.

5.7.4 Vorkulturmedien

Durch Vorkultur in unterschiedlichen Medien entstanden keimspezifische Resistenzunterschiede gegenüber dem Aldehyd-Standard.

Die Züchtung in Standard-I-Bouillon bewirkte bei *Staph. aureus* und *P. aeruginosa* höhere Resistenzstufen verglichen mit denen nach Kultur in anderen Medien.

Eine Vorkultur in CSA und CSL erzeugte für *Staph. aureus*, die Bebrütung auf Brain-Heart-Infusion-Agar für *P. aeruginosa* die geringsten Resistenz-niveaux.

Für *Strept. faecalis* hingegen ergab sich folgende Nährmediumordnung bezogen auf absteigende Resistenzstufen: Brain-Heart-Infusion-Agar, CSA, CSL und Standard-I-Bouillon.

Bemerkenswert erscheint, daß nach Vorkultur in Standard-I-Bouillon bei *Staph. aureus* und *P. aeruginosa* die höchste, bei *Strept. faecalis* jedoch die niedrigste Resistenzstufe erzeugt wurde jeweils verglichen mit den Ergebnissen der 3 anderen Medien.

6.0 Diskussion

Inaktivierungsmedien können sowohl die Rückgewinnungsrate als auch die Rekultivierbarkeit einer inokulierten Keimmenge bei konstanter Desinfektionsmittelkonzentration und -einwirkungszeit beeinflussen. Erstere, indem durch unterschiedliches Desinfektionsmittelneutralisationsvermögen Differenzen in der Anzahl der rekultivierbaren Keime auftreten; letztere, indem durch schädigende Wirkung der Substanzen selbst, bzw. der bei der Desinfektionsmittelinaktivierung entstehenden Reaktionsprodukte, die rekultivierbaren Keime in unterschiedlichem Ausmaß zur Kolonienbildung befähigt sind.

In diesem Zusammenhang sei auf den erheblichen Einfluß von Zusammensetzung und Volumen des Nachkulturmediums sowie der Inkubationstemperatur auf die Keimrekultivierbarkeit hingewiesen. Es bestehen große Unterschiede in den Ansprüchen einer ungeschädigten Population und denen einer bereits vorgeschädigten Keimmenge ein und derselben Keimspezies bezüglich des Substratangebots. Die Nachkultur muß auf das Ausmaß der

Vorschädigung, die Art der Noxe und auf die unterschiedlichen Ansprüche der Keimspezies abgestimmt werden (26, 14). In dieser Arbeit wurde als Nachkulturmedium einheitlich Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Agar (Volumen 20 ml, Durchmesser der Nährbodenschale 9 cm) und als Inkubationstemperatur 37⁰ C gewählt. Obwohl es durchaus möglich ist, daß bei Verwendung anderer Nachkulturmedien bzw. Inkubationstemperaturen in dem einen oder anderen Versuch höhere KBE-Werte erzielt worden wären, kann dies vernachlässigt werden, weil die Bedingungen der Nachkultur in allen durchgeführten Quantitativen Suspensionstests konstant gehalten wurden.

Die chemische Beschaffenheit des zu prüfenden Desinfektionsmittels spielt bei der Auswahl des Inaktivierungsmittels eine erhebliche Rolle. Es gibt noch kein Substanzgemisch, das in der Lage wäre, alle auf dem Markt befindlichen chemischen Präparationen gleichermaßen optimal zu neutralisieren. Die in Frage kommenden Medien müssen also desinfektionsmittelspezifisch auf ihre Eignung getestet werden.

Die Sensitivität gegenüber einer schädigenden Wirkung eines Inaktivierungsmittels, bzw. der bei der Desinfektionsmittelneutralisation entstehenden Reaktionsprodukte, hängt außer vom Zustand der Keimpopulation (Vorschädigung, keine Schädigung) auch von der Keimspezies ab. Die Resistenz bezüglich einer potentiell toxischen Substanz variiert zwischen den einzelnen Keimspezies.

Nur unter Berücksichtigung beider Aspekte - chemische Beschaffenheit des Desinfektionsmittels einerseits, Keimspezies andererseits - kann folglich die Eignung eines Inaktivierungsmittels ermittelt werden.

Das in dieser Arbeit getestete 0,5 %ige Natriumsulfit wird von einer Reihe von Autoren als Inaktivierungsmittel empfohlen; nach RUBBO und GARDNER (28), SNYDER und CHEATLE (30), sowie nach den Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel (1) soll es zur Neutralisation von Aldehydpräparaten verwendet werden. GREEN und LITSKY (11) empfehlen Natriumsulfit auch zur Neutralisation von Desinfektionsmitteln auf Jodophorbasis. Eine ausgeprägte antibakterielle Wirkung dieser Substanz wurde von keinem der genannten Autoren beobachtet. Im Gegensatz dazu schreiben BERGAN und LYSTAD (7) Natriumsulfit eine solche antibakterielle Wirkung zu. Dieser Widerspruch läßt sich durch methodische Unterschiede aufklären:

GREEN und LITSKY (11) haben z. B. folgende Versuchsanordnung gewählt: Zu Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung gaben sie einerseits ein Gemisch aus Desinfektionsmittel und Natriumsulfit, andererseits nur Natriumsulfit. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit Wasser und Natriumsulfit. Danach erfolgte die Beimpfung mit einer Keimsuspension. Nach den jeweiligen Einwirkungszeiten wurden Verdünnungen angelegt und diese auf Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Agar-Platten überimpft. Im Gegensatz dazu prüften BERGAN und LYSTAD (7) die Eignung eines Inaktivierungsmittels in Ansätzen ohne Nährmedium. Anstelle von Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung benutzten sie steriles Leitungswasser. In beiden Versuchsanordnungen wurde u. a. E. coli als Testkeim verwendet.

Die Unterschiede in den Ergebnissen kamen offenbar dadurch zustande, daß in der Versuchsanordnung von GREEN und LITSKY die inokulierte Keimmenge ein Milieu vorfand, das die Sensitivität der Bakterien gegenüber schädigenden Einflüssen - sei es nun der Desinfektionsmittelrest oder das Inaktivierungsmittel selbst - dahingehend veränderte, daß nach der Einwirkungszeit noch eine große Anzahl von rekultivierbaren Keimen entnommen werden konnte. Die Rekultivierbarkeit der entnommenen Keimmenge war in einem relativ geringen Ausmaß beeinträchtigt worden, so daß in der Nachkultur eine große Zahl angewachsener Kulturen resultierte. BERGAN und LYSTAD dagegen wählten als Milieu steriles Leitungswasser; die toxischen Effekte, sowohl des Desinfektionsmittelrestes als auch des Inaktivierungsmittels, kamen voll zum Tragen, die Anzahl der rückgewinnbaren Keime war geringer, und die Rekultivierbarkeit der entnommenen Keimmenge wurde herabgesetzt, so daß am Ende weitaus weniger Kolonien zu zählen waren.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch in dieser Arbeit erzielt. Fraglos erwies sich Natriumsulfit, geprüft im Bakteriotastaseversuch nach den Richtlinien der DGHM, als Inaktivierungsmittel eines Aldehydgemisches bei allen Testkeimen den anderen Substanzen als überlegen. Im Gegensatz dazu wurden für Natriumsulfit im Quantitativen Suspensionstest deutlich höhere Reduktionsfaktoren (niedrigere Anzahl von KBE/ml in der Nachkultur) ermittelt verglichen mit denen der 4 organischen Inaktivierungsmedien (3 Testkeime, Aldehydgemisch).

Diese Diskrepanz - nach dem Ergebnis des Bakteriotastaseversuchs gilt Natriumsulfit als geeignet, nach dem des Quantitativen Suspensionstests als ungeeignet zur Neutralisation des Aldehydstandards - läßt sich auch hier zwanglos auf die Unterschiede in der Methodik zurückführen.

Im Bakteriotastaseversuch kommt seine aldehydinaktivierende Wirkung voll zur Geltung. Seine antibakteriellen Eigenschaften werden dadurch verdeckt, daß

ungeschädigte Keime zu einem nährmediumhaltigen Gemisch aus Inaktivierungsmittel und Desinfektionsmittel gegeben werden. Im Quantitativen Suspensionstest dagegen kommen durch Desinfektionsmittelwirkung bereits vorgeschädigte Bakterien zu dem in doppelt destilliertem Wasser verdünnten Natriumsulfit. Die mitübertragenen Desinfektionsmittelreste werden möglicherweise vollständig neutralisiert; die toxischen Eigenschaften dieser Substanz jedoch bewirken bei den bereits vorgeschädigten Keimen eine weitere Verschlechterung ihrer Rekultivierbarkeit, es wächst eine geringere Anzahl von Kolonien in der Nachkultur, was sich dann letztendlich in einem höheren Reduktionsfaktor niederschlägt. Die Kontrollen im Quantitativen Suspensionstest zeigten aber, daß nach Einwirkung von Wasser standardisierter Härte keine bedeutende Verschlechterung der Rekultivierbarkeit eintrat. Die Keime wiesen hier keine Vorschädigung auf; die antibakteriellen Eigenschaften von Natriumsulfit kamen nicht zur Auswirkung.

Im Falle von Natriumsulfit beweist sich also, daß die Bewertung seiner Eignung zur Inaktivierung von Desinfektionsmitteln nicht nur von der chemischen Beschaffenheit des zu prüfenden Desinfektionsmittels und den Eigenschaften der Testkeime, sondern auch von der jeweils angewandten Testmethode abhängt. In den "Richtlinien zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel" (1) und auch in den "Empfehlungen für die Prüfung und Bewertung der Wirksamkeit chemischer Desinfektionsverfahren" (3) bleibt diese Abhängigkeit unberücksichtigt. Die zur Auswahl stehenden Inaktivierungsmittel werden im Bakteriostaseversuch zwar keim- und desinfektionsmittelspezifisch auf ihre Eignung getestet; die so ermittelten optimalen Substanzen sollen dann jedoch bei allen folgenden Testmethoden weiter Verwendung finden. Allerdings empfiehlt das Deutsche Autorenkollektiv (3) 4 organische Inaktivierungskombinationen, die unbedingt auf ihre Eignung getestet werden sollen.

Dies würde für Natriumsulfit bedeuten, daß im Quantitativen Suspensionstest eine völlig "ungeeignete" Substanz zur Inaktivierung von Desinfektionsmitteln auf Aldehydbasis zur Verwendung käme.

Bei der Bewertung von Inaktivierungsmitteln muß zusätzlich die jeweils angewandte Testmethode berücksichtigt werden, und die optimalen Substanzen sollten auch nur in der Versuchsanordnung, mit deren Hilfe ihre Eignung getestet wurde, verwendet werden.

Phosphatpuffer wurde von KUBICEK (17) zur Neutralisation der desinfizierenden Wirkung von Laugen und chlorhaltigen Desinfektionsmitteln empfohlen. Seine desinfektionsmittelinaktivierende Wirkung soll einerseits durch pH-Erniedrigung, andererseits durch die Abbindung von freiem Chlor verursacht sein. SPICHER und PETERS benutzten m/20 Phosphatpuffer pH 7 zur Inaktivierung von Formaldehyd bei Strept. faecalis (32). m/20 Phosphatpuffer pH 7 erwies sich in dieser Arbeit sowohl im Quantitativen Suspensionstest als auch im Bakteriostaseversuch zur Inaktivierung der 3 Desinfektionsmittel auf Aldehyd-, Phenol- und Jodophorbasis bei allen 3 Testkeimen als ungeeignet.

Die in den "Empfehlungen für die Prüfung und Bewertung der Wirksamkeit chemischer Desinfektionsverfahren" (3) angegebenen 4 organischen Inaktivierungsmittel (TLC, TSHC, TLH, TLH+Na.) zeigten hinsichtlich ihres Desinfektionsmittelneutralisationsvermögens und ihrer möglichen Eigentoxizität bei den 3 Desinfektionsmitteln und den 3 Testkeimen im Quantitativen Suspensionstest nur sehr geringe Unterschiede. Diese Differenzen konnten bezogen auf Testkeim und chemische Zusammensetzung des Desinfektionsmittels nur tendenzmäßig ermittelt werden. Trotz dieser minimalen Unterschiede erwies sich TSHC verglichen mit den 3 anderen organischen Inaktivierungsmitteln bei allen Testkeimen und Desinfektionsmitteln meist als optimal.

Durch Verwendung verschiedener Keimsuspensionsmedien bei sonst konstanten Bedingungen bezüglich Vor- und Nachkultur, sowie Desinfektionsmittelkonzentration und Einwirkungszeit waren erhebliche Unterschiede in den jeweils ermittelten Reduktionsfaktoren im Quantitativen Suspensionstest zu verzeichnen.

Die erzielten Ergebnisse sollten zuerst desinfektionsmittelspezifisch diskutiert werden: Bei Verwendung des Aldehydgemischs wurden nach Suspension in Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung bei allen Testkeimen höhere Reduktionsfaktoren als nach Suspension in physiologischer Kochsalzlösung und Verdünnungsflüssigkeit gefunden. Im Testansatz mit dem Phenol-Standard dagegen lagen die Reduktionsfaktoren nach Suspension in Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung bei allen Testkeimen niedriger als die nach Suspension in physiologischer Kochsalzlösung und Verdünnungsflüssigkeit. Dies traf auch auf den Versuch mit Jodophor zu, zumal hier nach Suspension in physiologischer Kochsalzlösung und Verdünnungsflüssigkeit kein Wachstum in der Nachkultur zu erkennen war.

Bei gleicher chemischer Beschaffenheit des Desinfektionsmittels konnten aber auch testkeimspezifische Unterschiede der Ergebnisse nach Suspension in den 3 Medien festgestellt werden: So lagen die Reduktionsfaktoren im Versuch mit Aldehyd nach Suspension in Verdünnungsflüssigkeit und physiologischer Kochsalzlösung für Staph. aureus und Strept. faecalis auf gleicher Höhe, während für P. aeruginosa höhere Reduktionsfaktoren nach Suspension in physiologischer Kochsalzlösung erzielt wurden als nach Suspension in Verdünnungsflüssigkeit. Im Testansatz mit dem Phenol-Standard nahm wiederum P. aeruginosa eine gewisse Sonderstellung ein: Zwar spielte auch hier die desinfektionsmittelspezifische Beeinflussung durch die Suspensionsmedien eine gewisse Rolle - wie auch bei Staph. aureus und Strept. faecalis wurden nach Suspension in Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung die niedrigsten, nach Suspension in physiologischer Kochsalzlösung die höchsten und nach Suspension in Verdünnungsflüssigkeit dazwischenliegende Reduktionsfaktoren erzielt - doch wiesen die bei diesem Testkeim ermittelten Reduktionsfaktoren deutlich höhere Unterschiede auf als die bei Strept. faecalis und Staph. aureus.

Vergleicht man die Reduktionsfaktoren, die sich nach unterschiedlicher Keimverweildauer (30 Min., 5 Std.) in einem Suspensionsmedium ergeben, so lagen bei allen Testkeimen die Reduktionsfaktoren nach 5 Std. nach Suspension in Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung im Ansatz mit Jodophor niedriger als die nach 30 Min.. Dies läßt sich durch die Abnahme der bakteriziden Wirksamkeit einer angesetzten Jodophorlösung über die Zeit erklären, was auch chemisch nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu muß der Versuch mit Phenol hinsichtlich der unterschiedlichen Keimverweildauer testkeimspezifisch erläutert werden: Strept. faecalis nahm hier eine Sonderstellung ein, da die Reduktionsfaktoren nach 5 Std. bei allen Suspensionsmedien höher lagen als die nach 30 Min., während sie nach 5 Std. bei P. aeruginosa und Staph. aureus nach Suspension in Verdünnungsflüssigkeit und Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung niedriger waren als die nach 30 Min..

Allen Versuchen, unabhängig von Testkeim und Desinfektionsmittel, war gemeinsam, daß die Anzahl der KBE der Kontrollen - also nach Einwirkung des jeweiligen Suspensionsmediums und Wasser standardisierter Härte - sowie die Ausgangskeimzahlen in einem sehr engen Streubereich lagen. Die Suspensionsmedien selbst konnten demnach keine bakterizide Wirkung auf die Keime ausüben.

Als Ursachen der erheblichen Unterschiede in den Resultaten müssen eine Resistenzbeeinflussung durch das jeweilige Suspensionsmedium und/oder eine Wirkungsveränderung des Desinfektionsmittels durch überpipettierte Suspensionsmedium diskutiert werden:

Die Rezepturen der Suspensionsmedien zeigen, daß die Ionenmengen der 3 Medien sich nur geringfügig unterschieden (Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung: 5 g NaCl und 2,5 g K_2HPO_4 ; physiologische Kochsalzlösung: 8,5 g NaCl; Verdünnungsflüssigkeit: 8,5 g NaCl jeweils auf 1000 ml Aqua dest.), während weitaus größere Differenzen im jeweiligen Gehalt an Nährmedium zu verzeichnen waren (Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung: 17,0 g Caseinpepton und 3,0 g Sojabohnenmehlpepton; physiologische Kochsalzlösung: kein Nährmedium; Verdünnungsflüssigkeit: 1 g Bacto-Trypton jeweils auf 1000 ml Aqua dest.). Wird berücksichtigt, daß Wasser standardisierter Härte - hier als Verdünnungsmittel für die jeweiligen Desinfektionsmittel benutzt - eine relativ hohe Ionenmenge ($0,53 \text{ g CaCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$, $0,15 \text{ g MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ auf 1000 ml) hatte, so ist eine mögliche Wirkungsveränderung der Desinfektionsmittel durch überpipettierte Ionen der jeweiligen Suspensionsmedien sicherlich auszuschließen.

Eine Beeinflussung der bakteriziden Wirksamkeit der Desinfektionsmittel durch mitübertragenes Nährmedium erscheint jedoch denkbar. Es ist bekannt, daß Proteine die Wirkung von Desinfektionsmitteln auf Jodophor- und Phenolbasis durch Adsorption stark herabsetzen (13). Dies konnte eindrucksvoll beim Vergleich der benötigten Konzentrationen des Jodophor- und Phenol-Standards im Bakteriostaseversuch mit denen im Quantitativen Suspensionstest gezeigt werden. Im Bakteriostaseversuch hat sich weiterhin gezeigt, daß in einem nährmediumhaltigen Milieu die anzusetzenden Grenzkonzentrationen des Aldehyd-Standards niedriger waren als die im Quantitativen Suspensionstest. Eine Wirkungszunahme des Aldehyds durch die puffernde Wirkung von Protein erscheint durchaus möglich.

Dies würde die Tatsache erklären, daß unabhängig von den spezifischen Eigenschaften der Testkeime die Reduktionsfaktoren nach Suspension in Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung bei Verwendung von Phenol und Jodophor niedrigere Werte aufwiesen als die nach Suspension in physiologischer Kochsalzlösung und Verdünnungsflüssigkeit; nach den oben dargestellten Erkenntnissen hätten die minimalen Mengen an übertragenem Caseinpepton und Sojabohnenmehlpepton von der Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung die bakterizide Wirksamkeit von Phenol und Jodophor herabgesetzt, während nach Suspension in physiologischer Kochsalzlösung kein Wirkungsverlust und nach Suspension in Verdünnungsflüssigkeit zumindest bei Phenol eine geringere Abnahme der Wirksamkeit als nach Suspension in Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung zu verzeichnen wäre.

Für den Versuch mit Aldehyd hätte dann folgendes Geltung: Die mit-übertragenen Proteinmengen von Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung würden die bakterizide Wirksamkeit verstärken - die Reduktionsfaktoren lagen nach Suspension in Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung höher als die nach Suspension in Verdünnungsflüssigkeit und physiologischer Kochsalzlösung - während die Aldehydwirksamkeit durch überpipettierte chemische Stoffe von physiologischer Kochsalzlösung und Verdünnungsflüssigkeit unbeeinflußt geblieben wäre.

In diesem Zusammenhang sei noch ein möglicher Einwand relativiert: Die Eiweißbelastung der angesetzten Desinfektionsmittelkonzentrationen durch mitübertragene Proteinmengen war äußerst gering (0,1 ml Keimsuspension wurde zu 10 ml Desinfektionsmittellösung gegeben): Sie betrug bei Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung 0,002 g Casein- und Sojabohnenmehlpepton und bei Verdünnungsflüssigkeit 0,0001 g Bacto-Trypton. Es sei darauf hingewiesen, daß in dieser Arbeit mit relativ geringen Desinfektionsmittelkonzentrationen gearbeitet wurde, die in einem Grenzbereich zwischen Desinfektionsmittelunwirksamkeit und völliger Abtötung durch das Desinfektionsmittel lagen. Minimale Wirksamkeitsveränderungen bewirken dann erhebliche Unterschiede in den Ergebnissen.

Mit dieser Hypothese sind die Differenzen der Resultate erklärbar, die sich unabhängig von den unterschiedlichen Eigenschaften der Testkeime ergaben, also bei allen Testkeimen gleichermaßen nachweisbar waren.

Es zeigten sich aber, wie oben dargestellt, auch testkeimspezifische Unterschiede in den Ergebnissen innerhalb eines Versuchsansatzes mit nur einem Desinfektionsmittel, die nur durch den Einfluß der Keimsuspensionen auf die Resistenz der jeweiligen Testkeime zu erklären sind.

So ist bekannt, daß die Sensitivität von Strept. faecalis und Staph. aureus gegenüber physiologischer Kochsalzlösung geringer ist als die von P. aeruginosa (29). Tatsächlich stimmten die Differenzen der Reduktionsfaktoren zwischen den 3 Suspensionsmedien bei Verwendung von Phenol und Aldehyd für Staph. aureus und Strept. faecalis weitgehend überein, während P. aeruginosa eine gewisse Sonderstellung einnahm. Auch die ermittelten Differenzen bezüglich der unterschiedlichen Keimverweildauer in einem Suspensionsmittel lassen sich nur mit einer möglichen testkeimspezifischen Einflußnahme des jeweiligen Suspensionsmediums auf die Resistenz begründen.

Letztendlich bleibt die Frage offen, welcher der beiden Mechanismen in erster Linie für die testkeim- und desinfektionsmittelspezifischen Unterschiede der Ergebnisse verantwortlich ist.

Unabhängig von dieser Problematik muß auf die bedeutende Rolle der Keimsuspensionsmedien bei Desinfektionsmitteltestungen hingewiesen werden. Immerhin lagen die ermittelten Resultatsdifferenzen zwischen den 3 Suspensionsmedien bei Prüfung von Aldehyd in einem Bereich zwischen 0,44 und 3,2 Zehnerpotenzen. Bei Phenol trat nach Suspension in physiologischer Kochsalzlösung kein Wachstum (Reduktionsfaktor $> 5,8$) in der Nachkultur auf, während nach Suspension in Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung ein Reduktionsfaktor von 1,21 erzielt wurde. Bei Verwendung von Jodophor konnte bei identischer Konzentration und Einwirkungszeit bezüglich eines Testkeims nach Suspension in physiologischer Kochsalzlösung und Verdünnungsflüssigkeit kein Wachstum verzeichnet werden, wohingegen nach Suspension in Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung deutliches Wachstum in der Nachkultur auftrat; z. B. Reduktionsfaktor nach Suspension in Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung 0,81, Reduktionsfaktor nach Suspension in physiologischer Kochsalzlösung $> 5,21$.

Es ist deshalb notwendig, auch die Frage der Keimsuspensionsmedien bei der Standardisierung der Testmethoden zur Bewertung der Wirksamkeit von Desinfektionsverfahren zu berücksichtigen. Der Einfluß des Suspensionsmediums auf die Keimresistenz und die Desinfektionsmittelwirkung sollte möglichst konstant gehalten werden, indem nur eines der zur Auswahl stehenden Medien Verwendung findet.

PEYBROUCK (25) hat darauf hingewiesen, daß die Resistenz von *P. aeruginosa* gegenüber einem phenolhaltigen Desinfektionsmittel durch unterschiedliche Nährmedien sowie durch Variation von Bebrütungszeit und -temperatur verändert werden kann.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluß von 4 verschiedenen Nährmedien auf die Resistenz von *Staph. aureus*, *P. aeruginosa* und *Strept. faecalis* gegenüber einem Desinfektionsmittel auf Aldehydbasis im Quantitativen Suspensionstest untersucht. Es konnten beträchtliche, testkeimspezifische Unterschiede in den Ergebnissen ermittelt werden. Diese Differenzen sind eindeutig auf die durch die verschiedenen Nährmedien hervorgerufenen, unterschiedlichen Resistenzen zurückzuführen, weil eine mögliche Beeinflussung durch das Suspensionsmedium zu vernachlässigen ist, da für alle Testansätze das gleiche Medium (Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung) benutzt wurde.

Ordnet man die 4 Nährmedien entsprechend der durch sie verursachten, absteigenden Resistenzstufen, so ergab sich bei *Staph. aureus* folgende Reihung: Standard-I-Bouillon, Brain-Heart-Infusion-Agar, Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Agar, Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung; bei *P. aeruginosa*: Standard-I-Bouillon, Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung, Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Agar, Brain-Heart-Infusion-Agar; bei *Strept. faecalis*: Brain-Heart-Infusion-Agar, Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Agar, Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung, Standard-I-Bouillon. Die ermittelten Differenzen der Reduktionsfaktoren nach unterschiedlicher Vorkultur lagen bei *Staph. aureus* in einem Bereich zwischen 0,02 und 1,96, bei *P. aeruginosa* zwischen 0,27 und 2,71, und bei *Strept. faecalis* zwischen 0,17 und 2,09 Zehnerpotenzen.

Die Resistenz einer Keimspezies gegenüber einem Desinfektionsmittel hängt von ihren natürlichen Eigenschaften ab. Es gibt Resistenzunterschiede zwischen verschiedenen Bakterienarten. Diese durch die spezifischen Eigenschaften einer Keimart verursachte Resistenz kann aber in einem erheblichen Ausmaß durch unterschiedliche Versuchsbedingungen geändert werden. Sollen Resistenzunterschiede verschiedener Keimspezies gegenüber einem Desinfektionsmittel ermittelt werden, so muß jeder einzelne Schritt innerhalb einer Testmethode - also von der Vor- bis zur Nachkultur - bei allen geprüften Keimen konstant bleiben. Nur unter diesen Bedingungen ist es erlaubt, ermittelte Resistenzunterschiede auf die ungleichen Eigenschaften der Testkeime zurückzuführen, da mögliche Einflüsse auf die Resistenz durch Vorkultur, Temperatur, Suspensionsmedium etc. für alle Testkeime gleich bleiben. Weiterhin sollte beachtet werden, daß die ermittelten Resistenzunterschiede sich immer nur auf die angewandte Testmethodik beziehen, da bei Änderung der Versuchsanordnung andere Resultate erzielt werden können.

Im Quantitativen Suspensionstest z. B. war die Resistenz von *Strept. faecalis* unter den in 5.2.1 beschriebenen Bedingungen gegenüber dem Aldehyd-Standard 2,8 bzw. 4,25mal höher als die von *P. aeruginosa* bzw. *Staph. aureus*; im Bakteriostaseversuch (5.3.2.1) dagegen war die von *P. aeruginosa* 1,3 bzw. 2,6mal höher als die von *Strept. faecalis* bzw. *Staph. aureus*. Die Resistenz gegenüber dem Phenolgemisch lag für *P. aeruginosa* im Quantitativen Suspensionstest um den Faktor 10 bzw. 33,3 höher als die von *Staph. aureus* bzw. *Strept. faecalis*, im Bakteriostaseversuch allerdings nur um den Faktor 6,6 bzw. 4.

In diesem Zusammenhang sei auf die von SPICHER und PETERS (32) ermittelten Resistenzunterschiede vegetativer Keime gegenüber Formaldehyd eingegangen. Ihre Aussage, daß *Strept. faecalis* eine höhere Resistenz gegenüber Formaldehyd als andere vegetative Keime besitzt, konnte im Quantitativen Suspensionstest dieser Arbeit bestätigt werden.

Allerdings wurde in ihrer Versuchsanordnung vernachlässigt, dass die Resistenz eines Keimes, bedingt durch seine spezifischen Eigenschaften, durch unterschiedliche Vorkultur usw. in erheblichem Ausmaß beeinflusst werden kann.

Sie wählten als VorkulturmEDIUM für *Strept. faecalis* Brain-Heart-Infusion-Agar, für alle anderen getesteten Keime jedoch Bouillon-Agar. Zur Formaldehydinaktivierung wurden alle Keime in 0,5 %igem Natriumsulfit verdünnt außer *Strept. faecalis*, bei dem die erste Verdünnung in Phosphatpuffer und erst danach in 0,5%igem Natriumsulfit erfolgte. Durch diese Veränderung der Methodik werden die keimspezifischen Resistenzen der geprüften Testkeime in unterschiedlicher Weise verändert, was einen relativen Vergleich nicht zulässt.

Abschließend sei deshalb darauf hingewiesen, daß sich alle aus dieser Arbeit abgeleiteten Aussagen ausschließlich auf die angewandte Methodik, die geprüften Testkeime sowie auf die verwendeten Desinfektionsmittel beziehen. Eine Übertragung dieser Resultate auf andere Verhältnisse (Methodik, Testkeime, Desinfektionsmittel) ist aus den oben dargestellten Überlegungen nicht zulässig.

0 Empfehlungen

Aus den in der Diskussion getroffenen Aussagen lassen sich Empfehlungen für die Prüfung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln im Quantitativen Suspensionstest ableiten. Es soll damit nicht bezweckt werden, für jeden Testkeim und jedes Desinfektionsmittel Bedingungen vorzuschlagen, mit deren Hilfe die höchstmögliche Resistenz, Rückgewinnungsrate und Rekultivierbarkeit erzielt werden kann. Dies würde eine keim- oder desinfektionsmittelspezifische Bevorzugung bedeuten. Vielmehr wird versucht, Substanzen auszuwählen, bei denen für alle in dieser Arbeit verwendeten Testkeime und Desinfektionsmittel Resultate erzielt werden, die zwischen den Extremwerten liegen.

-0,5%iges Natriumsulfit ist wegen seiner hohen Eigentoxizität zur Inaktivierung von Desinfektionsmitteln auf Aldehydbasis ungeeignet.

-m/20 Phosphatpuffer (pH 7) sollte wegen seiner geringen Inaktivierungskapazität nicht mehr zur Neutralisation von Desinfektionsmitteln auf Aldehydbasis verwendet werden.

- TSHC eignet sich zur Inaktivierung von Desinfektionsmitteln auf Aldehyd-, Phenol- und Jodophorbasis; in diesem Zusammenhang erscheint nur eine vergleichende Testung mit Verdünnungsflüssigkeit als Inaktivierungsmittel notwendig
- Als Keimsuspensionsmedium wird Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung vorgeschlagen
- Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung sollte als Vorkulturmedium für alle Testkeime dienen
- Nur bei der Testung von aldehydhaltigen Desinfektionsmitteln sollte *Strept. faecalis* als Testkeim berücksichtigt werden

8.0 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Einflüsse von 3 verschiedenen Faktoren (Vorkulturmедien, Suspensionsmedien, Inaktivierungskombinationen) auf die Keimresistenz von *Staph. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *Strept. faecalis* ATCC 6075 und auf die Desinfektionsmittelwirksamkeit im Quantitativen Suspensionstest untersucht. Als Desinfektionsmittel dienten Standardansätze auf Aldehyd-, Jodophor- und Phenolbasis.

Die 6 geprüften Inaktivierungskombinationen unterschieden sich bezüglich ihrer Eigentoxizität und ihrem Inaktivierungsvermögen testkeim- und desinfektionsmittelspezifisch.

Zur Inaktivierung des Aldehyd-Standards erwiesen sich Natriumsulfit und Phosphatpuffer im Quantitativen Suspensionstest als ungeeignet; im Bakterio­staseversuch nach den Richtlinien der DGHM dagegen war Natriumsulfit den anderen Inaktivierungskombinationen bei der Neutralisation des Aldehydgemischs deutlich überlegen.

Die Eignung eines Inaktivierungsmittels hängt demnach außer von der chemischen Beschaffenheit des Desinfektionsmittels und den spezifischen Eigenschaften der Testkeime auch von der angewandten Testmethodik ab.

Zwischen den 4 organischen Inaktivierungskombinationen (TLC = 3 % Tween 80, 0,3 % Lecithin, 0,1 % Cystein; TSHC = 3 % Tween 80, 3 % Saponin, 0,1 % Histidin, 0,1 % Cystein; TLH = 3 % Tween 80, 0,3 % Lecithin, 0,1 % Histidin; TLH+Na. = wie TLH jedoch mit 0,5 % Natriumthiosulfat) konnten keine großen Unterschiede festgestellt werden. Ihr Vermögen, Desinfektionsmittel auf

Aldehyd-, Jodophor- und Phenolbasis zu neutralisieren, sowie ihre Eigen-toxizität waren in etwa gleich zu bewerten.

Die geprüften Suspensionsmedien hatten einen erheblichen Einfluß auf die Wirksamkeit der Desinfektionsmittel und auf die Keimresistenz. Eine unterschiedliche Verweildauer der Keime in den Suspensionsmedien wurde in der Testmethodik berücksichtigt.

Suspension in Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung bewirkte nach Einwirkung des Aldenhyd-Standards weniger Wachstum in der Nachkultur als Suspension in Verdünnungsflüssigkeit oder physiologischer Kochsalzlösung. Nach Suspension in Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung konnte bei Verwendung von phenol- und jodophornhaltigen Desinfektionsmitteln jedoch stärkeres Wachstum in der Nachkultur verzeichnet werden als nach Suspension in Verdünnungsflüssigkeit oder physiologischer Kochsalzlösung. Die ermittelten Werte zwischen den einzelnen Suspensionsmedien unterschieden sich zum Teil bei identischer Desinfektionsmittelkonzentration und -einwirkungszeit um 4 Zehnerpotenzen. Testkeimspezifische Differenzen waren ebenfalls nachweisbar.

Durch unterschiedliche Vorkulturmedien wurde die Resistenz gegenüber dem Aldehyd-Standard testkeimspezifisch verändert. Die höchsten Resistenzstufen wurden bei *P. aeruginosa* und *Staph. aureus* nach Vorkultur in Standard-I-Bouillon, bei *Strept. faecalis* jedoch nach Vorkultur auf Brain-Heart-Infusions-Agar erreicht. Die Unterschiede der Ergebnisse betrugen zum Teil 2 Zehnerpotenzen.

Im Quantitativen Suspensionstest war die durch die jeweiligen keimspezifischen Eigenschaften verursachte Resistenz von *Strept. faecalis* gegenüber dem Aldenhyd-Standard 2,8 bzw. 4,2-mal höher als die von *P. aeruginosa* bzw. *Staph. aureus*. Gegenüber dem Phenol-Standard zeigte sich jedoch, daß die Resistenz von *P. aeruginosa* um den Faktor 10 bzw. 33,3 höher lag als die von *Staph. aureus* bzw. *Strept. faecalis*. Gegenüber dem Jodophor-Standard zeigten die Testkeime keine großen Unterschiede in ihrem Resistenzverhalten.

In dieser Arbeit konnte unter anderem gezeigt werden, daß bei konstanter Desinfektionsmittelkonzentration und -einwirkungszeit durch Variation der Vorkulturmedien, der Suspensionsmedien sowie der Inaktivierungskombinationen erhebliche Unterschiede in den ermittelten Resultaten auftreten. Um eine exakte Wertbestimmung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln zu ermöglichen, muß eine unerwünschte Beeinflussung durch unterschiedliche Vorkultur- und Suspensionsmedien sowie Inaktivierungskombinationen vermieden werden. Eine weitgehende Standardisierung der Testmethodik erscheint deshalb dringend erforderlich.

1. Adam, W., K. Grossgebauer, L. Grün, K. Heicken, Th. Lammers,
K. Liebermeister, K. Mülhens, H. Ostertag, C. A. Primavesi,
B. Schmidt, K. Wagener und R. Wohlrab:
Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel.
3. Aufl., G. Fischer Verlag Stuttgart (1972)
2. Association of Official Analytical Chemists:
Use-dilution method.
J. Ass. Off. Anal. Chem. 53 (1970) 61
3. Beck, E. G., J. Borneff, L. Grün, K.-O. Gundermann, E. Kanz,
Th. Lammers, K. Mülhens, C. A. Primavesi, B. Schmidt, R. Schubert,
E. Weinhold und H.-P. Werner:
Empfehlungen für die Prüfung und Bewertung der Wirksamkeit
chemischer Desinfektionsverfahren.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 165 (1977) 335
4. Bellinger, H.:
Untersuchungen über die Ausschaltung der Entwicklungshemmung
bei der Prüfung von Desinfektionsmitteln auf der Basis von
Amphotensiden.
Tenside 12 (1966) 413
5. Bergan, T. und A. Lystad:
Evaluation of phenolics by a quantitative technique.
Acta path. microbiol. scand. Section B. 80 (1972) 71
6. Bergan, T. und A. Lystad:
Evaluation of non-phenolics by a quantitative technique.
Acta path. microbiol. scand. Section B. 80 (1972) 79
7. Bergan, T. und A. Lystad:
Evaluation of disinfectant inactivators.
Acta path. microbiol. scand. Section B. 80 (1972) 507

8. Bisping, W. und G. Kirpal:
Untersuchungen zur Prüfungsmethodik von Desinfektionsmitteln.
I. Mitt.: Die bakteriellen Testkeime.
Arch. Lebensmittelhyg. 7 (1973) 157
9. Engley, F. B. und B. P. Dey:
A universal medium for antimicrobial chemicals.
CSMA Proc. 56th Mid-Year Meet. (1970)
10. Flett, L. H., R. C. Haring, A. F. Guiteras und R. L. Shapiro:
The revival of organisms presumably killed by phenol.
J. Bact. 50 (1945) 591
11. Green, B. L. und W. Litsky:
The use of sodium sulfite as a neutralizer for evaluating
povidone-iodine preparations.
Hlth. Lab. Sci. 11 (1974) 188
12. Geppert, J.:
Zur Lehre von den Antiseptics.
Berl. Klin. Wschr. 26 (1889) 789, 819
13. Grün, L. und U. Heyn:
Der Serumfehler in der Desinfektionspraxis.
Geshw.Desinf.12 (1974)182
14. Harris, N. D.:
The influence of the recovery medium and the incubation
temperature on the survival of damaged bacteria.
J. appl. Bact. 26 (1963) 377
15. Kelsey, J. C.:
Disinfectants and methods of testing.
J. med. Lab. Technol. 26 (1969) 79

16. Kommission für Phytopharmacie:
Wertbestimmung von zur Verwendung in der Lebensmittelindustrie
bestimmten Desinfektionsmitteln und kombinierten Reinigungs-
Desinfektionsmitteln.
Niederlande (1972)
17. Kubiček, K.:
Interruption of disinfection effect of lyes and chlorine
preparations in microbiological control disinfection.
Acta Vet. 38 (1969) 589
18. MacKinnon, I. H.:
The use of inactivators in the evaluation of disinfectants.
J. Hyg. (Camb.) 73 (1974) 189
19. Nash, T. und A. Hirsch:
The revival of formaldehyde-treated bacteria.
J. appl. Chem. 4 (1954) 458
20. Nösler, H. G.:
Beitrag zur Inaktivierung von Organozinnverbindungen.
Geshw. Desinf. 1 (1970) 10
21. Perkins, F. T. und D. A. A. Mossel:
The testing of disinfectants.
Alimenta 2 (1971) 67
22. Reber, H.:
Desinfektion: Vorschlag für eine Definition.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 157 (1973) 421
23. Reber, H.:
Grundsatzfragen zu Anforderungen an Desinfektionsverfahren:
Das Schweizer Modell.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 157 (1973) 478

24. Reichenbach, H.:

Die Absterbeordnung der Bakterien und ihre Bedeutung für
Theorie und Praxis der Desinfektion.

Z. Hyg. Inf. Krankh. 69 (1911) 171

25. Reybrouck, G.:

Factors influencing the assessment of the pseudomonacidal
activity of disinfectants by a quantitative suspension test.

I. Influence of the growth condition of the test organism.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 165 (1977) 101

26. Reybrouck, G.:

Factors influencing the assessment of the pseudomonacidal
activity of disinfectants by a quantitative suspension test.

II. The post-disinfection recovery of surviving organisms.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 165 (1977) 113

27. Reybrouck, G. und H.-P. Werner:

Ausarbeitung eines neuen quantitativen in-vitro-Tests für
die bakteriologische Prüfung chemischer Desinfektionsmittel.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 165 (1977) 126

28. Rubbo, S. A. und J. F. Gardner:

A review of sterilization and disinfection.

Lloyd-Luke Ltd. (1965) 130

29. Smolka, L. R., F. E. Nelson und L. M. Kelley:

Interaction of pH and NaCl on enumeration of heat-stressed
Staphylococcus aureus.

Appl. Microbiol. 27 (1973) 443

30. Snyder, R. W. und E. L. Cheatle:

Alkaline glutaraldehyde - an effective disinfectant.

Amer. J. Hosp. Pharm. 22 (1965) 321

31. Spicher, G.:

Desinfektionsmittel und Desinfektionsverfahren unter besonderer Berücksichtigung der Faktoren, die ihre Wirksamkeit und Brauchbarkeit beeinflussen.

Path. Mikrobiol. 36 (1970) 259

32. Spicher, G. und J. Peters:

Resistenz mikrobieller Keime gegenüber Formaldehyd.

I. Vergleichende quantitative Untersuchungen an einigen ausgewählten Arten vegetativer Bakterien, bakterieller Sporen, Pilze, Bakteriophagen und Viren.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 163 (1976) 486

33. Werner, H.-P. und G. Reybrouck:

Zur Wertbestimmung von Desinfektionsmitteln in Europa.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Ref. 250 (1976) 97

34. Werner, H.-P., B. Rathmachers und J. Borneff:

Entwicklung einer neuen Prüfmethode für Flächendesinfektionsverfahren. V. Mitteilung: Bestimmung der Keimreduktion durch die Desinfektion.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 165 (1977) 60

10.0 Abkürzungen

B:	Standard-I-Bouillon
BHI-A:	Brain-Heart-Infusion-Agar
CSA:	Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Agar
CSL:	Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung
DIM:	Desinfektionsmittel
KBE:	Koloniebildende Einheit
$\log KBE_D$:	Anzahl der KBE nach Desinfektionsmitteleinwirkung
$\log KBE_O$:	Anzahl der KBE ohne Desinfektionsmitteleinwirkung (Kontrolle)
NaCl:	Physiologische Kochsalzlösung
RF:	Reduktionsfaktor
SHW:	Wasser standardisierter Härte
TLC:	Inaktivierungsmittel: 3 % Tween 80, 0,3 % Lecithin, 0,1 % Cystein
TLH:	Inaktivierungsmittel: 3 % Tween 80, 0,3 % Lecithin, 0,1 % Histidin
TLH+Na.:	Inaktivierungsmittel: wie TLH jedoch mit 0,5 % Natriumthiosulfat
TSHC:	Inaktivierungsmittel: 3 % Tween 80, 3 % Saponin, 0,1 % Histidin, 0,1 % Cystein
VF:	Verdünnungsflüssigkeit

Herrn Prof. Dr. H.-P. Werner möchte ich für die Überlassung des Themas und seine hilfreiche Beratung danken.

Fräulein Müller-Späth und Fräulein Grünhage gilt mein Dank für die Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Arbeit.

Für die Hilfe bei der schriftlichen Niederlegung der Arbeit möchte ich mich bei Frau Glaser bedanken.

Lebenslauf

Am 24.12.1950 wurde ich als Sohn von Frau Dr. Karin Engelhardt, geborene Wallmüller, und Herrn Dr. Albrecht Engelhardt in Rostock geboren.

1953 siedelten wir nach Mainz über. Nach 4 Jahren Volksschulbildung besuchte ich das Staatliche Gutenberg-Gymnasium Mainz, wo ich am 18.6.1969 das Abitur ablegte.

Im Sommersemester 1970 begann ich das Medizinstudium an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg. Nach Bestehen des Vorphysikums am 18.3.1971 und des Physikums am 28.9.1972 legte ich am 9.7.1976 das Staatsexamen ab.

Meine Medizinalassistentenzeit leistete ich an verschiedenen Krankenhäusern in Bremen ab. Am 3.11.1977 erhielt ich die Approbation als Arzt. Seit dem 15.3.1978 arbeite ich als Assistenzarzt am Zentral-krankenhaus "Links der Weser" in Bremen.

Ich bin unverheiratet.

